

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A61K 39/395 // C07K 16/18, C12P 21/08	A1	(11) 国際公開番号 WO95/20400 (43) 国際公開日 1995年8月3日 (03.08.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/00094 (22) 国際出願日 1995年1月26日 (26.01.95) (30) 優先権データ 特願平6/26334 1994年1月28日 (28.01.94) JP 特願平6/242328 1994年9月8日 (08.09.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)[JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 神奈木玲児(KANNAGI, Reiji)[JP/JP] 〒464 愛知県名古屋市中千種区振甫町1-122-B10 Aichi, (JP) 末松 誠(SUEMATSU, Makoto)[JP/JP] 〒160 東京都新宿区大京町26-4-301 Tokyo, (JP) 玉谷卓也(TAMATANI, Takuya)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬基礎研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル Osaka, (JP) (81) 指定国 CA, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : ANTI-INFLAMMATORY CONTAINING MONOCLONAL ANTIBODIES HAVING REACTIVITY WITH SIALYL-LEWIS X SUGAR CHAINS ORIGINATING IN HEMANGIOENDOTHELIAL CELL MEMBRANE (54) 発明の名称 血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる抗炎症剤 (57) Abstract <p>A leukocyte rolling inhibitor, leukocyte adhesion inhibitor, leukocyte tissue infiltration inhibitor, and anti-inflammatory, each containing monoclonal antibodies having a reactivity with sialyl-Lewis X sugar chains originating in the hemangioendothelial cell membranes of nonlymphatic tissues (e.g., brain, trachea, lung, liver, heart, pancreas, intestine, mesentery, kidney, skin or joint), preferably further sialyl-Lewis X sugar chains originating in the cell membranes of leukocytes. The above monoclonal antibodies have not only all of the anti-inflammatory effects of the conventional monoclonal antibodies against each of L-, E- and P-selectin proteins, but also the effect of inhibiting the earliest stages of local tissue inflammation, i.e., the rolling and adhesion of leukocytes on a hemangioendothelial cell membrane and the infiltration of leukocytes into extravascular tissues. Therefore the invention provides a potent anti-inflammatory having a novel action mechanism.</p>		

Applicants: David J. Pinsky et al.
 Serial No.: 10/679,135
 Filed: October 3, 2003
 Exhibit 6

(57) 要約

非リンパ性組織（例えば、脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚又は関節等）の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖、好ましくは更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球ローリング阻害剤、白血球接着阻害剤、白血球組織浸潤阻害剤、抗炎症剤に関する。

本発明におけるモノクローナル抗体は、従来のL-、E-又はP-セレクトインタンパクに対するモノクローナル抗体のそれぞれが有する抗炎症作用を合わせ持つのみならず、更に局所組織炎症反応過程の最も初期の段階、即ち、白血球の血管内皮細胞膜上でのローリング、接着及び白血球の血管外組織への浸潤を阻害する作用を有している。従って、本発明によれば、従来にない新しい作用メカニズムによる強力な抗炎症剤を提供することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RS	セルビア
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	SS	ス威士ランド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドバ	ST	セント・ヘレナ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
CC	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	モザンビーク	UA	ウクライナ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KE	ケニア	NE	ニジェール	US	米国
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	大韓民国	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク			PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明細書

血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に反応性を有する

モノクローナル抗体を含んでなる抗炎症剤

〔技術分野〕

本発明は、非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球ローリング阻害剤、該モノクローナル抗体を含んでなる白血球接着阻害剤、該モノクローナル抗体を含んでなる白血球組織浸潤阻害剤、及び該モノクローナル抗体を含んでなる抗炎症剤に関する。

〔背景技術〕

白血球の血管外への浸潤は、健康な生体のリンパ節の高内皮細静脈〔以下、H E V (high endothelial venule)という。〕において、該H E V細胞膜上への接着を経て常時起こっているが、このような接着、浸潤とは別に、一連の炎症反応過程においても同様に白血球の接着、血管外への浸潤が生じていることが知られている。すなわち、外的あるいは内的要因により生体局所組織に何らかの傷害が起こった場合、通常は血管血液中を高速で流れている白血球が、速やかに血管内皮細胞膜上へ遊走し（①白血球の遊走）、セレクトインと総称される接着分子等を介して血管内皮細胞膜に接着（tethering）して（②初期の接着）、血管内皮細胞膜上をローリングする（③ローリング）。さらに白血球は、インテグリン等の他の種々の接着分子を介して血管内皮細胞膜に強固に接着して（④強固な接着）、次いで白血球は血管内皮細胞と血管内皮細胞との間隙から血管外組織へ浸潤し（⑤浸潤）、障害組織部位へと移行して（⑥移行）一連の炎症反応が起こることとなる。

かかる過程のうち、特に①白血球の遊走から③ローリングに至るまでの過程、即ち、極めて高速の血流中から接着すべき白血球を識別選択し、該白血球を血管内皮細胞に誘導し、血管内皮細胞上をローリングさせる過程においては、セレクトインと総称される膜タンパクとそのリガンドが重要な役割を担っている〔セル(Cell), 第65巻, 859-873頁, 1991年, ローレンス(Lawrence MB)ら〕。

セレクトインとしては、これまでに白血球細胞膜上に発現しているL-セレクトイン(LAM-1, LECAM-1, Me1-14), 血管内皮細胞膜上に発現しているE-セレクトイン(ELAM-1)及び血管内皮細胞あるいは血小板の細胞膜上に発現しているP-セレクトイン(GMP-140, PADGEM, CD62)の3種が知られている。

このようなセレクトインが、白血球の血管内皮細胞膜上での接着及びローリング等に関与していることが明らかになるにつれ、セレクトインを介した白血球の血管内皮細胞膜上での接着やローリング等をコントロールすることにより、抗炎症効果が期待されることとなった。既に、腹膜炎、肺炎及び糖尿病、喘息、虚血後再灌流障害、火傷あるいは多発性臓器障害における炎症のモデルにおいて、L-セレクトインタンパク、E-セレクトインタンパクおよびP-セレクトインタンパクの各々に対するモノクローナル抗体を用いた抗炎症効果が確認され、その有効性が報告されている〔L-セレクトイン：ネイチャー(Nature), 第349巻, 164-167ページ, 1991年, ワトソン(Watson), S.R.ら；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 第90巻, 10494-10498ページ, 1993年, ヤング(Yang), X-Dら；E-セレクトイン：ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.), 第88巻, 1396-1406ページ, 1991年, マリガン(Mulligan), M.S.ら；ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.), 第88巻, 1407-1411 ページ, 1991年, ガンディール(Gundeel), R.H.ら；P-セレクトイン：ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.), 第91巻, 2620-2629ページ, 1993年, ウェイリッチ(Weyrich), A.S.ら、及びザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.), 第92巻, 2042-2047ページ, 1993年, ウィン(Winn), R.ら〕。

しかしながら、白血球の血管内皮細胞膜上への接着およびローリング等には、上記の3種のセレクトインが共働的に関与することから、L-セレクトインタンパクに対するモノクローナル抗体、E-セレクトインタンパクに対するモノクローナル抗体またはP-セレクトインタンパクに対するモノクローナル抗体のそれぞれを個

別に抗炎症剤として用いても十分な抗炎症効果は期待できない。

近年、E-セレクトリン及びP-セレクトリンに対する生体内リガンドの1つが、白血球の細胞膜上に発現しているシアリルルイスX (Sialyl Lewis X、SLeX) という糖鎖抗原であることが明らかとなり、さらにこれらのシアリルルイスXに反応性を有する抗体(抗シアリルルイスX抗体)として、特開平3-103190号公報開示の抗体(SNH-3)、特開昭61-63700号公報開示の抗体(CSLEX-1)、国際出願公開WO92/01718号公報開示の抗体及びFH-6等が知られている〔バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 第181巻, 1223-1230頁, 1991年, ハンダら; ザ・アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー(Am. J. Pathol.), 第141巻, 1259-1264頁, 1992年, パーボネン(Paavonen)ら〕。

しかしながら、これら既知の抗シアリルルイスX抗体について、白血球の血管内皮細胞膜上でのローリングや接着を阻害する作用、白血球の組織への浸潤を阻害する作用もしくは抗炎症作用が確認された等の報告は全くなされていない。

一方、L-セレクトリンに対する血管内皮細胞膜上にある生体内リガンドについては、L-セレクトリンがシアリルルイスXに結合すること、また、ある種のリンパ節のHEV細胞膜上にシアリルルイスXが発現していること等の知見から、その1つは血管内皮細胞膜上に発現しているシアリルルイスXであろうとの推測はされているものの、種々組織の血管内皮細胞膜上にシアリルルイスXの存在は確認されておらず、推測の域を出ていないのが実情である〔メビオ(Mebio), 第10巻, 5号, 26-31ページ, 1993年, 玉谷及びメビオ, 第10巻, 5号, 32-42ページ, 1993年, 鈴木〕。

従って、白血球細胞膜上にあるL-セレクトリンが、白血球の血管内皮細胞上でのローリング及び接着にどのように関与しているかについては未だ不明であり、その解明が望まれている。

かかる状況のもと、既知のいずれの抗体も白血球の細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖にしか反応性を示さないにもかかわらず、本発明者等は、本発明者らが調製したモノクローナル抗体がヒト白血球の細胞膜上のシアリルルイスXのみなら

ず、さらにヒトリンパ節、扁桃、虫垂及び腸間膜リンパ節組織等のリンパ性組織の血管内皮細胞に対しても反応性を有することを見出し、このことから、初めてリンパ性組織の血管内皮細胞膜上にもヒト白血球の細胞膜と同様にシアリルルイスXが存在することが明らかにされた〔日本免疫学会総会・学術集会記録、第22巻、1992年、3D4、神奈木ら；バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 第193巻、1号、337-347ページ、1993、神奈木ら〕。

しかしながら、当該モノクローナル抗体については、局所組織での炎症反応とは無関係に、健康な生体で白血球の血管外への浸潤が常時起きているリンパ節H E V細胞への白血球の接着を抑制する作用を有するとの知見が得られているに過ぎず、リンパ節以外の局所組織（非リンパ性組織）における作用については予測すらできず、未だ明らかにされていない（前記報文）。

〔発明の開示〕

本発明の目的は、非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球ローリング阻害剤、該モノクローナル抗体を含んでなる白血球接着阻害剤、該モノクローナル抗体を含んでなる白血球組織浸潤阻害剤、及び該モノクローナル抗体を含んでなる抗炎症剤を提供することである。

本発明者らは、上記の技術背景のもと、本発明者らが調製したモノクローナル抗体についてさらに鋭意研究をしていたところ、該モノクローナル抗体が、白血球およびリンパ性組織のみならず、更に非リンパ性組織の血管内皮細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するという知見を得た。そして、さらに研究を重ねた結果、該抗体は非リンパ性組織の血管内皮細胞膜上での白血球のローリングや接着及び白血球の組織への浸潤を強く阻害することにより、優れた抗炎症作用を有するという今まで知られていなかった優れた作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は下記(1)～(4)の少なくとも1つの特徴を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球ローリング阻害剤である。

- (1) 非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有する。
- (2) 脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚及び関節からなる群、好ましくは肺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、関節及び皮膚からなる群から選ばれる少なくとも1つの非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有する。
- (3) (1)または(2)の特徴に加えて、さらに白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有する。
- (4) 国際寄託番号FERM BP-4525で識別されるハイブリドーマから産生される。

また、本発明は上記(1)～(4)の少なくとも1つの特徴を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球接着阻害剤である。

さらにまた、本発明は上記(1)～(4)の少なくとも1つの特徴を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球組織浸潤阻害剤である。

また、本発明は上記(1)～(4)の少なくとも1つの特徴を有するモノクローナル抗体を含んでなる抗炎症剤、該モノクローナル抗体を含んでなる急性炎症に対する抗炎症剤、該モノクローナル抗体を含んでなる脳、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚または関節における炎症に対する抗炎症剤、該モノクローナル抗体を含んでなる虚血後再灌流障害、移植後免疫拒絶、火傷あるいは多発性臓器障害に係わる炎症に対する抗炎症剤である。

〔図面の簡単な説明〕

図1中、Aはモノクローナル抗体2H5のシアリルルイスX糖鎖に対する反応性を示すグラフ。Bはモノクローナル抗体2H5のシアリルルイスa糖鎖に対する反応性を示すグラフ。各図の縦軸はモノクローナル抗体2H5の反応性(%)を表し、横軸はシアリルルイスX糖鎖もしくはシアリルルイスa糖鎖の濃度(n g/ウェル)を表す。▲-▲はモノクローナル抗体2H5の反応性、○-○はモノクローナル抗体SNH-3の反応性および△-△はモノクローナル抗体2D3の反応性を示す。

図 2 は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヒト末梢リンパ節間質細胞膜タンパク上のシアリルルイスXに対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示す図面に代わる電気泳動写真。レーン 1 は可溶化タンパクの電気泳動、レーン 2 はモノクローナル抗体 S N H - 3 の反応性を示す電気泳動、及びレーン 3 はモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示す電気泳動をそれぞれ示す。

図 3 は、モノクローナル抗体 2 H 5 のラット白血球（好中球）細胞膜上のシアリルルイスXに対する反応性を示すグラフ。縦軸は相対細胞数を表し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 4 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにアイソタイプマッチマウス I g M を用いた場合（対照）の、該抗体のラット白血球（好中球）細胞膜上のシアリルルイスXに対する反応性を示すグラフ。縦軸は相対細胞数を表し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 5 は、モノクローナル抗体 2 H 5 のヒト白血球（単球）細胞膜上のシアリルルイスXに対する反応性を示すグラフ。縦軸は相対細胞数を表し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 6 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにアイソタイプマッチマウス I g M を用いた場合（対照）の、該抗体のヒト白血球（単球）細胞膜上のシアリルルイスXに対する反応性を示すグラフ。縦軸は相対細胞数を表し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 7 は、モノクローナル抗体 2 H 5 のヒト白血球（顆粒球）細胞膜上のシアリルルイスXに対する反応性を示すグラフ。縦軸は相対細胞数を表し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 8 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにアイソタイプマッチマウス I g M を用いた場合（対照）の、該抗体のヒト白血球（顆粒球）細胞膜上のシアリルルイスXに対する反応性を示すグラフ。縦軸は相対細胞数を表し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 9 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の末梢リンパ節血管内皮細胞上のシアリルルイスXに対する反応性を示す倍率 2 5 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した

部分（一例）が強く染色されている。

図 1 0 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、末梢リンパ節切片の倍率 2 5 倍における顕微鏡写真。

図 1 1 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腸間膜リンパ節血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 2 5 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 1 2 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の肝臓血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 5 0 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 1 3 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の肝臓血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 1 0 0 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 1 4 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、肝臓切片の倍率 5 0 倍における顕微鏡写真。

図 1 5 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腎臓（髄質）血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 1 0 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 1 6 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腎臓（髄質）血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 1 0 0 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 1 7 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、腎臓（髄質）切片の倍率 1 0 倍における顕微鏡写真。

図 1 8 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腎臓（皮質）血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 1 0 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 1 9 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の脾臓血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 1 0 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 20 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、脾臓切片の倍率 10 倍における顕微鏡写真。

図 21 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の肺血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 50 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 22 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、肺切片の倍率 50 倍における顕微鏡写真。

図 23 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腸間膜血管血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 50 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 24 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、腸間膜血管切片の倍率 50 倍における顕微鏡写真。

図 25 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腸間膜血管（動脈）血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 200 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 26 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、腸間膜血管（動脈）切片の倍率 200 倍における顕微鏡写真。

図 27 は、モノクローナル抗体 2 H 5 の腸間膜血管（静脈）血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対する反応性を示す倍率 200 倍における顕微鏡写真。矢印で例示した部分（一例）が強く染色されている。

図 28 は、一次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M を用いた場合（対照）の、腸間膜血管（静脈）切片の倍率 200 倍における顕微鏡写真。

図 29 は、ヒスタミンにより炎症を誘導したラット炎症モデルにおける、モノクローナル抗体 2 H 5 投与による白血球の血管内皮細胞上への接着阻害効果を示すグラフ。縦軸は腸間膜の後毛細血管細静脈 100 μ m あたりの血管内皮細胞上に接着した白血球の数を表し、横軸は時間（分）を表す。○-○はモノクローナ

ル抗体 2 H 5 投与群での値を表し、●－●は対照群での値を表す。

図 3 0 は、ヒスタミンにより炎症を誘導したラット炎症モデルにおける、モノクローナル抗体 2 H 5 投与による白血球の血管内皮細胞膜上のローリング阻害効果を示すグラフ。縦軸は白血球数の割合 (%) 表し、横軸は血管内皮細胞膜上をローリングする白血球の相対速度 (%) を表す。

図 3 1 は、チオグリコレートにより炎症を誘導したラット腹膜炎モデルにおける、モノクローナル抗体 2 H 5 の投与による白血球の組織浸潤阻害効果を示すグラフ。縦軸は組織に浸潤した全白血球数 (個) を示す。

図 3 2 は、ノイラミニダーゼ処理をしていないヒト白血球 (好中球) に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示すグラフ (実線)。なお、点線はマウス I g M (対照抗体) の反応性を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は蛍光強度 (対数) を表す。

図 3 3 は、ノイラミニダーゼ処理をしたヒト白血球 (好中球) に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示すグラフ (実線)。なお、点線はマウス I g M (対照抗体) の反応性を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は蛍光強度 (対数) を表す。

図 3 4 は、ノイラミニダーゼ処理をしていないラット白血球 (好中球) に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示すグラフ (実線)。なお、点線はマウス I g M (対照抗体) の反応性を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は蛍光強度 (対数) を表す。

図 3 5 は、ノイラミニダーゼ処理をしたラット白血球 (好中球) に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示すグラフ (実線)。なお、点線はマウス I g M (対照抗体) の反応性を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は蛍光強度 (対数) を表す。

図 3 6 は、ノイラミニダーゼ処理をしていないマウス白血球 (好中球) に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示すグラフ (実線)。なお、点線はマウス I g M (対照抗体) の反応性を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は蛍光強度 (対数) を表す。

図 3 7 は、ノイラミニダーゼ処理をしたマウス白血球（好中球）に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を示すグラフ（実線）。なお、点線はマウス I g M（対照抗体）の反応性を示す。縦軸は相対細胞数を示し、横軸は蛍光強度（対数）を表す。

図 3 8 は、P B S 投与群における心筋虚血後再灌流後のラット左心室の切片を撮影した図面に代わる写真。

図 3 9 は、モノクローナル抗体 2 H 5 投与群における、心筋虚血後再灌流後のラット左心室の切片を撮影した図面に代わる写真。

図 4 0 は、ラット心筋虚血後再灌流障害モデルにおける、モノクローナル抗体 2 H 5 またはラット I g M の前投与による障害抑制効果（抗炎症効果）を示すグラフ。縦軸は左心室切片全面積中に占める壊死（梗塞）領域の割合（％）を示す。

図 4 1 は、E-セレクトリンと H L - 6 0 細胞との結合に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の影響（効果）を示すグラフ。縦軸は蛍光強度を示す。横軸に示す a は形質転換していない C O S 細胞への H L - 6 0 の結合の結果を示し、b ~ g は E-セレクトリン遺伝子を導入した C O S 細胞への H L - 6 0 の結合の結果を示す。b ~ g 中、b はいずれの抗体も加えない場合の結果を、c は対照マウス I g M を $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、d はモノクローナル抗体 2 H 5 を $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、e はモノクローナル抗体 2 H 5 を $3 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、f は P-セレクトリン抗体を $5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、g は E-セレクトリン抗体を $20 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を示す。

図 4 2 は、P-セレクトリンと H L - 6 0 細胞の結合におけるモノクローナル抗体 2 H 5 の効果を示すグラフ。縦軸は蛍光強度を示す。横軸に示す a は形質転換していない C O S 細胞への H L - 6 0 の結合の結果を示し、b ~ g は P-セレクトリン遺伝子を導入した C O S 細胞への H L - 6 0 の結合の結果を示す。b はいずれの抗体も加えない場合の結果を、c は対照マウス I g M を $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、d はモノクローナル抗体 2 H 5 を $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、e はモノクローナル抗体 2 H 5 を $3 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、f は P-セレクトリン抗体を $5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ 加えた場合の結果を、g は E-セレクトリン

抗体を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた場合の結果を示す。

〔発明の詳細な説明〕

以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「非リンパ性組織」とは、免疫担当リンパ球を作り出し、あるいは貯蔵するリンパ節、扁桃及び脾臓等の末梢リンパ性組織、及び該末梢リンパ性組織で作られ免疫担当リンパ球のもととなる前駆細胞を作り出す胸腺等の中枢リンパ性組織以外の組織を意味する。具体的には脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸（小腸、大腸）、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻粘膜及び関節等の組織を挙げることができる。好適には肺、肝臓、心臓、脾臓、皮膚、関節及び腎臓等の組織である。

本発明における「白血球」とは、一般に白血球と総称されるリンパ球、好中球、好酸球、好塩基球または単球等をいう。

本発明でいう「シアリルルイスX糖鎖」とは、その構造の少なくとも一部にシアル酸残基とルイスX糖鎖構造とを含有する糖鎖を意味する。すなわち、該糖鎖は構造中に少なくともシアル酸残基とルイスX糖鎖構造とを有していればよく、シアル酸残基とルイスX糖鎖構造との位置関係、ルイスX糖鎖以外の糖鎖の構造や長さ等に特に制限されず、また直鎖状または分岐鎖状のいずれの糖鎖構造を有していてもよい。

具体的には、糖脂質の命名法における略記法〔有機化学、生化学命名法（下）、南江堂、平山健三ら参照〕を用いて2次元的に表記すると、構造中の少なくとも一部に、NeuAcで表されるシアル酸残基とGal($\beta 1-4$)[Fuc($\alpha 1-3$)]GlcNAc-で表されるルイスX糖鎖構造とを含む糖鎖が挙げられ、より具体的には（1）NeuAc($\alpha 2-3$)Gal($\beta 1-4$)[Fuc($\alpha 1-3$)]GlcNAc-で表される糖鎖構造を含む、糖鎖の長さに特に制限されない直鎖状または分岐鎖状の糖鎖構造、（2）NeuAcで表されるシアル酸残基とGal($\beta 1-4$)[Fuc($\alpha 1-3$)]GlcNAc-で表されるルイスX糖鎖構造の各々を糖鎖構造全体中に離れて有する、糖鎖の長さに特に制限されない直鎖状の糖鎖構造、または（3）NeuAcで表されるシアル酸残基とGal($\beta 1-4$)[Fuc

($\alpha 1-3$)]GlcNAc-で表されるルイスX糖鎖構造の各々を、糖鎖構造全体中に直結してまたは離れて有する、糖鎖の長さに特に制限されない分岐鎖状の糖鎖構造を有する糖鎖が挙げられる。

また、本発明でいう「シアリルルイスX糖鎖」には、上記の如く2次的に示される「シアリルルイスX糖鎖」が生体内においてとり得る種々の3次的立体構造物も包含される。

さらに、本発明でいう「シアリルルイスX糖鎖」は、非リンパ性組織の血管内皮細胞膜もしくは白血球の細胞膜に由来するものであれば特にその存在態様に制限されず、細胞膜上に発現（存在）している態様のものであっても、該細胞膜上から抽出・単離された態様のものであってもよい。また、非リンパ性組織の血管内皮細胞膜もしくは白血球の細胞膜に由来する「シアリルルイスX糖鎖」と同一構造を有しているものであれば、人工的に合成されたものであってもよい。また、細胞膜上に発現（存在）している態様の「シアリルルイスX糖鎖」は、その膜上の存在形式によっても特に制限されず、細胞膜上のタンパクもしくは脂質等のいずれにいかなる態様で存在していてもよい。

本発明でいう「モノクローナル抗体」は、少なくとも非リンパ性組織の血管内皮細胞膜に由来するシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体であり、好ましくは更に白血球の細胞膜に由来するシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するモノクローナル抗体である。具体的には、後述する実施例1及び2に準じて調製され得るハイブリドーマ、好ましくは国際寄託番号FERM BP-4525で識別されるハイブリドーマから産生され得るモノクローナル抗体が例示される。

本発明でいう「モノクローナル抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE等のいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体であってもよく、好ましくはIgGまたはIgMイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体である。

また、本発明における「モノクローナル抗体」は、その製造・取得方法に特に制限されない。例えば、一般的に用いられる抗体製造方法、例えばケーラー及び

ミルシュタインらの方法 (Nature, 256, 495-497頁, 1975年) またはそれに準じる修飾方法に従って、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマから製造することができる。具体的には、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスを用いて、先に述べた「シアリルルイスX糖鎖」もしくは該糖鎖を含むものを抗原として、該抗原を皮下、筋肉内あるいは腹腔内に1〜数回注射（免疫感作）した後、該免疫感作動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは免疫感作動物と同種の動物（マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、好ましくはマウス、ラットまたはヒト）の骨髄腫系細胞（ミエローマ）との融合により得られる融合細胞（ハイブリドーマ）をインビトロで培養して該培養上清から取得する方法、もしくは該ハイブリドーマを同種動物（マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウス）の腹水中あるいは血清中（インビボ）で培養することにより該腹水あるいは血清から取得する方法等が例示される。

ここで、細胞融合に用いられる骨髄腫系細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8, P3/NSI/1-Ag4-1, P3/X63-Ag8.U1, SP2/0-Ag14, F0 あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag1.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11あるいはCEM-T15 を挙げることができる。また、モノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素抗体法によって測定することにより行うことができる。さらに、モノクローナル抗体の精製、単離は、上述のような方法により取得されるモノクローナル抗体を含有する血清、腹水あるいは培養上清を、飽和硫酸アンモニウム、ユークロブリン沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロ

マトグラフィーに供すること等により行うことができる。

このようにして製造される「モノクローナル抗体」は、免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明における「モノクローナル抗体」はこのような糖鎖の構造上の差異によって何ら限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。

また本発明における「モノクローナル抗体」には、遺伝子工学的に作製される「キメラモノクローナル抗体」、「ヒューマナイズドモノクローナル抗体」および「ヒト型モノクローナル抗体」等も包含される。

以下、これらの抗体の作製方法の一例について具体的に説明するが、本発明でいうモノクローナル抗体は、かかる記載によって特に制限されるものではない。

(i) 「キメラモノクローナル抗体」

当該「キメラモノクローナル抗体」は、実験医学、臨時増刊号、Vol. 6, No. 10, 1988年、特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。具体的には、例えば第1の動物の抗体産生細胞のDNAから単離した活性なV_H遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に第2の動物から単離したC_H遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また第1の動物の抗体産生細胞のDNAから単離した活性なV_L遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流に第2の動物から単離したC_L遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

特に「キメラモノクローナル抗体」として、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体の場合には、例えば以下の方法が用いられる。

まず、常法により作製されるマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI, HindIII等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば、0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25M HCl

溶液に15分間浸す。次いで、0.4N NaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベキニング（75℃、3時間）を行う。ベキニング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1% SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1% SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。次に、この中に³²P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC-0.1% SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、目的マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A, Charon 28, λEMBL 3, λEMBL 4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392, NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ〔H鎖J遺伝子, L鎖（κ）J遺伝子等〕を用いて、例えばベントンデイス法（Science, 196, 180-182, 1977年）に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV_H (VDJ) 遺伝子あるいはV_L (VJ) 遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒトC_H 遺伝子及びヒトC_L 遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG₁ とのキメラ抗体を作製する場合には、C_H 遺伝子であるC_{γ1} 遺伝子とC_L 遺伝子であるC_κ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利

用してヒトC γ 1遺伝子及びヒトC κ 遺伝子に相当するマウスC γ 1遺伝子及びマウスC κ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には例えば、クローンI g l 4 6 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4709-4713, 1978年)からの3 k bのH i n d III-B a m H I断片とクローンM E P 1 0 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 474-478, 1981年)からの6.8 k bのE c o R I断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのH a e III-A l u Iゲノムライブラリー (Maniatisら、Cell, 15, 1157-1174, 1978)中から、ヒトC κ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC γ 1遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをH i n d IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9 k bのバンドを λ 7 8 8に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

このようにして単離されたマウスV H 遺伝子とマウスV L 遺伝子、及びヒトC H 遺伝子とヒトC L 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスV H 遺伝子の下流にヒトC H 遺伝子を、またマウスV L 遺伝子の下流にヒトC L 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばp S V 2 g p tあるいはp S V 2 n e o等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウスV H 遺伝子/ヒトC H 遺伝子とマウスV L 遺伝子/ヒトC L 遺伝子のキメラ遺伝子は、一の発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63 \cdot Ag8 \cdot 653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、D E A E-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

(ii) 「ヒューマナイズドモノクローナル抗体」

当該「ヒューマナイズドモノクローナル抗体」は、非ヒト動物のモノクローナル抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域(CDR 1, CDR 2, CDR 3)から成るCDR部位

(complementarity-determining residue, 相補性決定部位)の全てあるいはその一部以外の全ての領域が、ヒトモノクローナル抗体の対応領域と置き代わったモノクローナル抗体(CDR-grafted モノクローナル抗体)であり、前記のキメラモノクローナル抗体の場合と同様に、例えば特表平4-506458号, 特開昭62-296890号等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。

すなわち、前述のハイブリドーマ等のような特定のマウスモノクローナル抗体産生細胞から、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該H鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒト免疫グロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子/ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子/ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒューマナイズド抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒューマナイズドモノクローナル抗体を得る。

(iii) 「ヒト型モノクローナル抗体」

「ヒト型モノクローナル抗体」は、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子をマウスの遺伝子中に組み込むことにより作製されたトランスジェニックマウスに特定の抗原を免疫感作して、前述と同様にして得ることができるモノクローナル抗体であり、前述のキメラモノクローナル抗体およびヒューマナイズドモノクローナ

ル抗体と比べ、全ての領域がヒト免疫グロブリン遺伝子に由来するものである。

このヒト型モノクローナル抗体を産生するトランスジェニックマウスは、例えば Nature Genetics, Vol.7, p13-21, 1994年及び特表平4-504365号公報記載の方法、あるいは Nature, Vol.368, p856-859, 1994年及び特表平6-500233号公報記載の方法に従って作製することができる。

以上詳述する本発明の「モノクローナル抗体」は、一般的に下記①～⑤のように表述される、炎症反応を媒介する一連のステップ、すなわち、通常血管内の血液中を高速で流れている白血球（リンパ球，好中球，好酸球，好塩基球または単球等）の、①血管内皮細胞膜への遊走、②セレクチンを介する血管内皮細胞膜への初期の接着、③血管内皮細胞膜上でのローリング、④該ローリングを経て起こるインテグリンを介した血管内皮細胞膜への強固な接着、及び⑤該強固な接着を経て起こる白血球の血管外組織への浸潤といった一連の反応系の少なくともいずれか一つのステップでの反応を抑制もしくは阻害することができる。

従って、本発明における「モノクローナル抗体」は、白血球ローリング阻害剤、白血球接着阻害剤または白血球組織浸潤阻害剤として、さらには上記ステップを経て生じる炎症を予防または治療する抗炎症剤として臨床上有用である。

本発明の「白血球ローリング阻害剤」は、上記のモノクローナル抗体、即ち非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体、好ましくは該反応性に加えて更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するモノクローナル抗体を含むことを特徴とする製剤である。当該「白血球ローリング阻害剤」は、上記③のステップで生じる（もしくは生じている）白血球の非リンパ性組織の血管内皮細胞膜上でのローリングの度合を減少させるか、該ローリングを阻害する作用を有している。具体的には、該製剤の作用機序は、シアリルルイスX糖鎖とセレクチンとの結合を介して血管内皮細胞と接着しながらローリングしている白血球の回転を速め、再度血流にのせることにより、ローリングを抑制・阻害するものと考えられる。

また本発明の「白血球接着阻害剤」は、上記のモノクローナル抗体、即ち非リ

ンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体、好ましくは該反応性に加えて更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するモノクローナル抗体を含むことを特徴とする製剤である。当該製剤は、上記①乃至④のステップで生じる（もしくは生じている）白血球の非リンパ性組織の血管内皮細胞膜への接着の度合を減少させるか、該接着を阻害する作用を有する。

さらにまた本発明の「白血球組織浸潤阻害剤」は、前述のモノクローナル抗体、即ち非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体、好ましくは該反応性に加えて更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するモノクローナル抗体を含むことを特徴とする製剤である。当該製剤は、上記⑤のステップで生じる（もしくは生じている）白血球の血流中（血管内）から血管外への浸出、即ち組織への浸出（浸潤）の度合を減少させるか、該浸出（浸潤）を阻害する作用を有する。

また本発明の「抗炎症剤」は、前述のモノクローナル抗体、即ち非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体、好ましくは該反応性に加えて更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するモノクローナル抗体を含むことを特徴とする製剤である。当該製剤は、上記①～⑤のいずれか少なくとも一つのステップで生じる反応を抑制・阻害することに基づいて、組織の炎症反応を予防または抑制・阻害（治療）する作用を有する。

本発明でいう「炎症」、すなわち本発明の抗炎症剤が対象とする「炎症」とは、内的要因または細菌感染、外傷、熱・寒冷・放射線・電気等の物理的刺激あるいは化学物質等の外的要因に限定されない種々要因による生体組織の傷害あるいは機能不全において、白血球が血管内皮細胞上でのローリング、接着を経て血流中から血管外組織へと浸潤することに起因する血管及び隣接する組織の細胞学的・組織学的反応の動的な複合体からなる基本的な病理学上の局所反応を意味する。

通常「炎症」は、その発現速度及び進行速度により、慢性炎症と急性炎症とに大別することができる。一般に慢性炎症とは、比較的ゆっくりあるいは徐々に、

またはその発現の存否すら不明確な程度に発現し、数週間ないし数年にわたり持続され、その終了も不明確な炎症を意味し、急性炎症とは、反応が比較的急速に発現し進行が速く、比較的その終了が明確な炎症を意味する。本発明でいう「急性炎症」とは、前述の如く通常の急性炎症としての意味を有するものである。

また、本発明における「炎症」としては脳、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻粘膜あるいは関節等の組織における炎症を例示することができ、具体的には脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、脾炎、腸炎、腹膜炎、皮膚炎、腎炎あるいは関節炎（例えば、関節リウマチ）、及び虚血後再灌流障害、移植後免疫拒絶、火傷あるいは多発性臓器障害に係わる炎症を挙げることができる。

本発明の抗炎症剤が対象とする「炎症」としては、特に「急性炎症」を挙げることができ、具体的には脳、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻粘膜あるいは関節等の組織における急性期の炎症、例えば急性肝炎、急性肺炎、または虚血後再灌流障害、移植後免疫拒絶、火傷あるいは多発性臓器障害に係わる急性炎症を挙げることができる。

本発明における「白血球ローリング阻害剤」、「白血球接着阻害剤」、「白血球組織浸潤阻害剤」または「抗炎症剤」はいずれも、先に述べた「モノクローナル抗体」を、例えば生理食塩水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1 \mu\text{g}$ 抗体/ ml 担体 $\sim 1 \text{mg}$ 抗体/ ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより注射剤として製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とする哺乳動物に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg}$ の割合で、好ましくは $50 \mu\text{g} \sim 50 \text{mg}$ の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

本発明の「白血球ローリング阻害剤」の白血球ローリング阻害作用は、例えば玉谷らの方法〔ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.), 第23巻, 2181-2188ページ, 1993年〕に従って、本発明におけるモノクローナル

抗体を投与することによる、血流中の白血球の回転移動速度（ローリング速度）を測定することにより確認することができる。

また本発明の「白血球接着阻害剤」の白血球接着阻害作用は、例えば、末松らの方法（ザ・アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー（Am. J. Physiol.），第264巻，H881-H891ページ，1993年）に従って、本発明におけるモノクローナル抗体を投与することによる、単位面積及び単位時間あたりの血管内皮細胞上の白血球の接着の阻害率を測定することにより確認することができる。

また本発明の「白血球組織浸潤阻害剤」の白血球組織浸潤阻害作用は、例えば、マヤダス（Tanya N. Mayadas）らの方法〔セル（Cell），第74巻，541-554ページ，1993年〕に従って、本発明におけるモノクローナル抗体を投与することによる、腹腔中の浸潤白血球数を測定することにより確認することができる。

さらに、本発明の「抗炎症剤」の特定の炎症に対する抗炎症作用は、例えば、マリガン（Mulligan）らの方法〔ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（J. Clin. Invest.），第91巻，577-587ページ，1993年〕に従って確認することができる。

本発明者らが調製したモノクローナル抗体は、E-セレクトリン及びP-セレクトリンの生体内リガンドの1つである白血球細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖のみならず、血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対しても反応性を有するものであり、本モノクローナル抗体を用いれば、血管内皮細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖、または血管内皮細胞膜上及び白血球細胞膜上双方のシアリルルイスX糖鎖を介する白血球の血管内皮細胞膜上でのローリング、接着、及び白血球の血管外組織への浸潤を阻害することができる。従って、本発明によれば、臨床上有用な「白血球ローリング阻害剤」、「白血球接着阻害剤」及び「白血球組織浸潤阻害剤」を提供することができる。

さらに、本発明におけるモノクローナル抗体は、前述した各セレクトリントタンパク（E-，P-，L-セレクトリン）に対するモノクローナル抗体のそれぞれが有する抗炎症効果を合わせ持っている。従って、本発明によれば、局所組織炎症反応過程の最も初期の段階、即ち、白血球の血管内皮細胞上でのローリング、接着及

び白血球の組織への浸潤を阻害することによる従来ない新しい作用メカニズムによる強力な抗炎症剤を提供することができる。

以下に、本発明の態様を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は、以下に記載される態様に限定されるものではないことは言うまでもない。

実施例 1 抗原（シアリルルイスX糖鎖を有する糖脂質）の調製

ヒト結腸癌細胞LS174T(ATCC CL188)を、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ(Dulbecco)MEM培地中で培養した。該腫瘍細胞をヌードマウス〔ハンドブック・オブ・イクスペリメンタル・イムノロジー(Handbook of Experimental Immunology), 第1巻, 9.1-9.39ページ, 1986年, 神奈木ら参照〕に移植し、腫瘍細胞を増殖させた。腫瘍組織を切除し、イソプロパノール/ヘキサン/水(55:20:25、V/V/V)からなる混合溶液で抽出処理し、全ての糖脂質を取得した。得られた全糖脂質をフォルチ(Folch)分配法により分配させ、上層の糖脂質画分をDEAE-セファデックス(Sephadex)A-25カラムクロマトグラフィー(ファルマシア社製)にかけた。該クロマトグラフィーにおいて、まず中性糖脂質をクロロホルム/メタノール/水(30:60:8、V/V/V)からなる溶出液で溶出させ(画分A)、次いでガングリオシドをクロロホルム/メタノール/0.8N酢酸ナトリウム(30:60:8、V/V/V)からなる溶出液で溶出させた(画分B)。得られた画分Bのガングリオシドを、更にクロロホルム/メタノール/2%ジクロロカルシウム(60:35:8、V/V/V)溶媒系を用いて薄層クロマトグラフィー〔以下、TLCという(HPTLCプレート〔Si-HPFプレート、ベーカーケミカル(J.I. Baker Chemical)社製〕及び¹²⁵I-プロテインA〔デュポン(Dupont)社製〕を使用〕により更に分離し、ついで、FH6モノクローナル抗体〔バイオメンブレイン・インスティテュート(Biomembrane Institute)より入手〕で免疫染色して〔ハンドブック・オブ・イクスペリメンタル・イムノロジー(Handbook of Experimental Immunology), 第4巻, 117.1-117.21ページ, 1986年, 神奈木ら参照〕、FH6モノクローナル抗体に交叉反応性を示す10糖残基以上の糖脂質を回収した。

さらに抗 I 抗体〔IgM-Ma、ピュージェットサウンドブラッドバンク (Puget Sound Blood Bank)、シアトル〕に対する反応性試験により、回収された糖脂質はシアリルルイス X 活性を有する糖脂質であり、分岐コア構造を有し、シアリルルイス X 活性を有する既知の短鎖糖脂質より長く複雑な炭水化物構造を有していることが確認された。

次いで、該シアリルルイス X 活性糖脂質を、サルモネラミネソタ (Salmonella minnesota) R 5 9 5 菌株 (ATCC 4 9 2 8 4) に吸収させた。

実施例 2 モノクローナル抗体の調製

以下に述べる抗体産生ハイブリドーマの調製は、ケーラー (Kohler) らの方法〔ブラッド (Blood), 第 81 巻, 101-111 ページ, 1993 年, 大森ら〕を参照しながら行い、また、モノクローナル抗体の調製は神奈木らの方法〔ハンドブック・オブ・イクスペリメンタル・イムノロジー (Handbook of Experimental Immunology), 第 4 巻, 117.1-117.21 ページ, 1986 年〕を参照しながら行った。

まず、実施例 1 で調製したシアリルルイス X 活性糖脂質を吸収させたサルモネラミネソタ R 5 9 5 菌株を免疫感作抗原として、該抗原を BALB/c マウスに 0 日目 ($7 \mu\text{g}$)、7 日目 ($15 \mu\text{g}$)、14 日目 ($23 \mu\text{g}$) および 28 日目 ($23 \mu\text{g}$) という間隔及び量で腹腔内投与した。最後の免疫感作から 3 日後に該マウスを開腹して脾臓細胞を採取し、常法によりマウスミエローマ細胞 P 3 / X 6 3 - A g 8 U 1 (P 3 U 1) (ATCC CRL 1 5 9 7) と融合させた。

得られたハイブリドーマの各々の培養上清を、実施例 1 で調製したシアリルルイス X 活性糖脂質を抗原として用いた固相免疫検定法 (Solid Phase Enzyme-Immunoassay) に常法に従って供し、該シアリルルイス X 活性糖脂質に反応性を有するハイブリドーマクローンを取得し、ハイブリドーマクローン 2 H 5 と命名した。このハイブリドーマを、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託番号 FERM BP-4 5 2 5 を以て寄託した。

ハイブリドーマクローン 2 H 5 を、無血清培地 (ASF 1 0 4、味の素㈱製) 中で培養して培養上清を回収し、遠心分離 (10,000 rpm で 10 分間) した。遠心

上清を回収し、I g M精製キット〔ピアス(Pierce)社製〕を用いてハイブリドーマクローン 2 H 5 産生モノクローナル抗体 (モノクローナル抗体 2 H 5 と命名) を精製した。

また、マウスモノクローナル抗体アイソタイプ同定キット〔アマーシャム (Amersham)社製〕を用いて、該モノクローナル抗体 2 H 5 のイムノグロブリンクラスを I g Mと同定した。

実施例 3 モノクローナル抗体 2 H 5 のシアリルルイス X 糖鎖に対する反応性

実施例 2 で調製したモノクローナル抗体 2 H 5 のシアリル化糖鎖抗原 (シアリルルイス X 糖鎖、シアリルルイス a 糖鎖を使用) に対する反応性を、96 穴マイクロタイタープレートを用い、箱守らの方法〔ハンドブック・オブ・イクスペリメンタル・イムノロジー (Handbook of Experimental Immunology), 第 1 巻, 9.1-9.39 ページ, 1986 年) を参照しながら E L I S A (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法により検討した。

シアリルルイス X 糖鎖抗原としては合成 NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc(β 1-1)Cer を、シアリルルイス a 糖鎖抗原としては合成 NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc(β 1-1)Cer を用いた。また酵素標識 2 次抗体としては、双方ともペルオキシダーゼ (Peroxidase) 標識ヤギ抗マウス I g M 抗体〔カッペル (Cappel) 社製〕を用いた。

なお、比較のため、モノクローナル抗体 2 H 5 の代わりに、既知の抗シアリルルイス X モノクローナル抗体である SNH-3〔I g M、バイオメンブランインスティテュート (Biomembrane Institute) 社より入手〕及び既知の抗シアリルルイス a モノクローナル抗体である 2 D 3 (I g M、Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 713-716, 1991 年及び Cancer Res., 53, 354-361, 1993 年参照) を用いた。

結果を図 1 の A 及び B に示す。

これから、本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5 が、シアリルルイス X 糖

鎖抗原のみに対し強い反応性を有することが確認された。

実施例 4 モノクローナル抗体 2 H 5 のリンパ節間質細胞膜上のシアリルルイス X 糖鎖に対する反応性

膜タンパク上にあるシアリルルイス X 糖鎖に対するモノクローナル抗体 2 H 5 の反応性を、レンムリ (Laemmli, U.K.) らの方法〔ネイチャー (Nature), 第 227 巻, 680-685 ページ, 1970 年〕を参照しながら 10% ポリアクリルアミドゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、SDS-PAGE という) により、ウェスタンブロッティング (Western blotting) 分析法により検討した。

イムノブロッティングのために、トウビン (Towbin) らの方法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U. S. A., 第 76 巻, 4350-4354 ページ, 1979 年〕を参照しながら、ドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDS という。タンパク可溶化剤) を用いて取得した可溶化ヒト末梢リンパ節間質細胞膜糖タンパクを SDS-PAGE にかけて、次いで、ニトロセルロース膜〔シュライハヤ・アンド・シュネール (Schleicher & Schnell) 社製〕に移した。そして、該ニトロセルロース膜をモノクローナル抗体 2 H 5 (IgM) と反応させ、次いで、酵素標識 2 次抗体としてのペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgM 抗体〔ザイメッド (Zymed) 社製〕と反応させた後、3, 3'-ジアミノベンジジン (3, 3'-diamino-benzidine) で発色させた。なお、対照としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりに SNH-3 (IgM、バイオメンブランインスティテュート (Biomembrane Institute) 社より入手) モノクローナル抗体を用いて同様に検討した。

結果を図 2 に示す。これから、モノクローナル抗体 2 H 5 が約 250 kD、110 kD 及び 90 kD のヒト末梢リンパ節間質細胞膜糖タンパクに反応性を有していることが示され、本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5 がリンパ節間質細胞膜に由来するシアリルルイス X に対して反応性を有することが確認された。

実施例5 モノクローナル抗体2H5のラット白血球細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖に対する反応性

蛍光色素標識抗体法による常法に従って、モノクローナル抗体2H5のラット白血球の細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖に対する反応性を検討した。

ウィスターラット(WKYラット)の末梢血を心臓採血により取得した。赤血球を不等張溶液により溶血させ、白血球を得た。白血球(1×10^6 個)をモノクローナル抗体2H5と反応させ、次いで、FITC(フルオロスセインイソチオシアネート)標識ヤギ抗マウスIgM抗体〔カッペル(Cappel)社製〕と反応させた後、好中球画分の蛍光強度をフローサイトメーター〔コールター(Coulter)社製〕を用いて測定した。

なお、対照としてモノクローナル抗体2H5の代わりにアイソタイプマッチマウスIgM〔シグマ(Sigma)社製〕を用いて同様に測定した。

結果を図3及び4に示す。これから、本発明におけるモノクローナル抗体2H5が、白血球細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖に対して強い反応性を有することが確認された。

実施例6 モノクローナル抗体2H5のヒト白血球細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖に対する反応性

実施例5と同様にして、モノクローナル抗体2H5のヒト白血球の細胞膜上のシアリルルイスX糖鎖に対する反応性を検討した。

採血した健常人の末梢血から、不等張溶液により赤血球を溶血し、白血球を得た。白血球(1×10^6 個)をモノクローナル抗体2H5と反応させ、次いで、FITC(フルオロスセインイソチオシアネート)標識ヤギ抗マウスIgM抗体〔カッペル(Cappel)社製〕と反応させた後、単球画分及び顆粒球画分の各々の蛍光強度をフローサイトメーター〔ベクトンディッキンソン(Becton Dickinson)社製〕を用いて測定した。

なお、対照としてモノクローナル抗体2H5の代わりにアイソタイプマッチマウスIgM〔シグマ(Sigma)社製〕を用いて同様に測定した。結果を図5～

図 8 に示す。本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5 が、ヒト白血球細胞膜上のシアリルルイス X 糖鎖に対して強い反応性を有することが確認された。

実施例 7 モノクローナル抗体 2 H 5 の、種々な組織の血管内皮細胞膜上のシアリルルイス X 糖鎖に対する反応性

ウィスターラット (W K Y ラット) から外科的手術により、末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び腸間膜血管を採取し、常法により各組織の凍結切片を調製した。調製した各切片を下記に述べるようにベクタステインエライト (Vectastain Elite) A B C キット (フナコシ株式会社製) を用いて染色した。

まず、各組織の凍結切片をアセトンで 1 ~ 2 分間固定化処理し、乾燥後、馬希釈血清 [P B S (10m l) / 血清 (150 μ l)] で浸潤させた。P B S で洗浄後、1 次抗体として実施例 2 で調製したモノクローナル抗体 2 H 5 (10 μ g / m l) を加えて 3 0 分間静置した。次いで、P B S で洗浄し、100 μ l のビオチン化 2 次抗体溶液 [P B S (5 m l) / ラット血清 (150 μ l) / ビオチン化抗マウス抗体 (50 μ l)] を加え、30 分間静置した。メタノール中に溶解した 3 % 過酸化水素溶液中で 1 0 分間静置し、P B S で洗浄した後、100 μ l のアビジン-ペルオキシダーゼ溶液 [P B S (5m l) / ペルオキシダーゼ標識アビジン D H (100 μ l) / ビオチン化過酸化水素 H (100 μ l)] を加え 3 0 分間静置した。P B S で洗浄後、D A B (ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド) 溶液 [水 (5m l) / 緩衝溶液 (100 μ l) / D A B 溶液 (200 μ l) / 過酸化水素溶液 (100 μ l) / ニッケル溶液 (100 μ l)] を加え、2 ~ 1 0 分間静置した。冷水で 5 分間洗浄した後、ギムザ (Giemsa) 染色法に供し、封入処理を行った。なお、1 次抗体としてモノクローナル抗体 2 H 5 の代わりにマウス I g M [ケムコン (Chemcon) 社製] を用いて前記と同様に染色したものを対照とした。

染色、封入された各組織切片を 1 0 ~ 2 0 0 倍の倍率にて顕鏡した。その結果を図 9 (顕微鏡写真) ~ 図 2 8 (顕微鏡写真) に示す。

末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び腸間膜血管の血管

内皮細胞が強く染色されており、本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5 は末梢リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓のようなリンパ性組織のみならず、肝臓、腎臓、肺及び腸間膜血管のような非リンパ性組織の血管内皮細胞上のシアリルルイス X に対し強い反応性を有することが確認された。

実施例 8 モノクローナル抗体 2 H 5 のヒスタミン誘導ラット炎症モデルにおける白血球接着阻害作用

ヒスタミンにより炎症を誘導したラット炎症モデルを用いて、モノクローナル抗体 2 H 5 の、白血球の血管内皮細胞膜への接着阻害作用を調べた。

12 週齢雄 W K Y s ラット (290 ~ 320 g、5 匹) に、ペントバルビタールナトリウム (40 m g / k g) を筋肉内注射して麻酔し、30 分間安定化させた。次いで、外科手術により開腹し腸間膜を引出し、95 % 窒素 / 5 % 酸素濃度下で灌流させた後、該腸間膜を正立型生体顕微鏡下に展開し、ビデオ撮影により 30 ~ 40 μ m の腸間膜の後毛細血管細静脈 (ポストキャピラリーベニキュール) の血管内皮細胞に接着する白血球の数を 15 分間計測した。次いで、モノクローナル抗体 2 H 5 [モノクローナル抗体 2 H 5 (600 μ l) / 生理食塩水 (900 μ l) で希釈] を 2 m g / k g 濃度で大腿静脈から 15 分間かけて静脈内投与した。該モノクローナル抗体 2 H 5 の投与終了から 15 分後、ヒスタミン (10 μ M) 溶液を腸間膜に添加した。ヒスタミン投与終了時 (0 分) から、10 分後、20 分後、30 分後及び 40 分後における顕微鏡下に展開された 30 ~ 40 μ m の腸間膜の後毛細血管細静脈の血管内皮細胞に接着する白血球の数を前記と同様にして計測した。

なお、モノクローナル抗体 2 H 5 を前投与しないでヒスタミン投与を行った群 (5 匹) を対照として用いた。

計測された白血球の数を、腸間膜の後毛細血管細静脈 100 μ m あたりの数に換算し標準偏差を求めた。結果を図 29 に示す。

その結果、本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5 は、炎症動物モデルにおいて、非リンパ性組織の炎症部位における白血球の血管内皮細胞膜への接着を有

意に阻害していることが確認され、当該モノクローナル抗体が抗炎症剤として有用であることが示唆された。

実施例 9 ヒスタミン誘導ラット炎症モデルにおけるモノクローナル抗体 2 H 5 の白血球ローリング阻害作用

ヒスタミンにより炎症を誘導したラット炎症モデルを用いて、本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5 の、白血球の血管内皮細胞膜上でのローリング阻害作用を調べた。

12週齢雄WKYsラット（290g～320g、4匹）に、ペントバルビタールナトリウム（40mg/kg）を筋肉内注射して麻酔し、30分間安定化させた。次いで、外科手術により開腹し腸間膜を引出し、95%窒素／5%酸素濃度下で灌流させた後、該腸間膜を正立型生体顕微鏡下に展開した。次いでモノクローナル抗体 2 H 5〔モノクローナル抗体 2 H 5（600 μ l）／生理食塩水（900 μ l）で希釈〕を2mg/kg濃度で大腿静脈に15分間かけて投与した。モノクローナル抗体 2 H 5の投与終了から15分後、ヒスタミン（10 μ M）溶液を腸間膜に添加した。モノクローナル抗体 2 H 5の投与前から、該展開腸間膜（30～40 μ m）の後毛細血管細静脈血流中の白血球及び赤血球の動態をビデオ撮影した。ヒスタミン投与終了時から30分後における血管内皮細胞膜上をローリングしながら流れている白血球の流速を、赤血球の流速に対する相対速度（%）として計測した。なお、モノクローナル抗体 2 H 5を前投与しないでヒスタミン投与を行った群（4匹）を対照として用いた。

結果を図30に示す。モノクローナル抗体 2 H 5投与群では、対照群に比べ、赤血球の流速に対する相対速度としての血管内皮細胞上のローリング速度（回転移動速度）が大きい白血球の割合が有意に増加しており、本発明におけるモノクローナル抗体 2 H 5が、炎症動物モデルにおいて、非リンパ性組織の炎症部位における白血球の血管内皮細胞上でのローリング（回転移動）を有意に阻害していることが確認され、このことから該モノクローナル抗体が抗炎症剤として有用であることが示唆された。

実施例 10 チオグリコレート誘導ラット腹膜炎モデルにおけるモノクローナル抗体 2H5 の白血球組織浸潤阻害作用

チオグリコレートにより炎症を誘導したラット腹膜炎モデルを用いて、実施例 2 で調製したモノクローナル抗体 2H5 の白血球組織浸潤阻害作用を調べた。

ドンリュウ (Donryu) ラット (6 週齢、各群 6 匹) に、エーテル麻酔下、モノクローナル抗体 2H5 (2 mg/kg/ml 生理食塩水) を尾静注した。その直後に、蒸留水に溶解したチオグリコレート (thioglycorate, 29 g/l) 水溶液 (5 ml) を腹腔内投与した。5 時間後、頸動脈切断により脱血死させ、開腹し、 0.5% BSA/ヘパリン (100 U/ml) /D-PBS の溶液 (5 ml) で腹腔を洗浄し、洗浄液を回収した。回収した洗浄液中に含まれる浸潤白血球数を、自動血球計数装置 (東亜医用電子社製) を用いて計測した。

なお、モノクローナル抗体 2H5 を前投与せずチオグリコレートのみを投与して同様の処理を行った群をポジティブコントロールとし、モノクローナル抗体 2H5 及びチオグリコレートとも未投与で同様の処理を行った群をネガティブコントロールとした。

結果を図 31 に示す。

モノクローナル抗体 2H5 が、炎症動物モデルにおいて、非リンパ性組織の炎症部位における白血球の血管外組織への浸潤を有意に阻害していることが確認され (本試験においては、 63% の阻害)、このことから該モノクローナル抗体が抗炎症剤として有用であることが示唆された。

実施例 11 モノクローナル抗体 2H5 のシアリルルイス X 糖鎖抗原 (シアリル化糖鎖抗原) に対する反応性の特異性

実施例 3～6 で、モノクローナル抗体 2H5 のシアリルルイス X 糖鎖抗原に対する反応性を確認した。

本実施例 11 では、モノクローナル抗体 2H5 のシアリルルイス X 糖鎖抗原に対する反応性の特異性を検討するために、ノイラミニダーゼで酵素処理することによりシアリルルイス X 糖鎖抗原 (シアリル化糖鎖抗原) の末端シアル酸を除去

した白血球（好中球）細胞と未処理の白血球（好中球）細胞との反応性を比較検討した。

ヒト健常ボランティア、WKYラット及びBALB/cマウスの各々から血液を採取し、不等張溶液により赤血球を溶血させ、白血球を得た。0.1 U/mlのノイラミニダーゼ〔ナカライテスク (Nacalai Tesque) 社製〕で37℃、1時間処理した白血球（ 1×10^6 個）と処理しない白血球（ 1×10^6 個）のそれぞれをモノクローナル抗体2H5と反応させ、次いでFITC標識抗マウスIgM〔カッペル (Cappel) 社製〕と反応させた後、染色された好中球画分の蛍光強度をエピックスエリート (EPICS-Elite) フローサイトメーターを用いて測定した。

なお、対照としてモノクローナル抗体2H5の代わりにマウスIgM〔ケムコン (Chemcon) 社製〕を用いて同様に測定した。

結果を図32～図37に示す。これから、本発明のモノクローナル抗体2H5は、ノイラミニダーゼ未処理の、即ちシアリル化された糖鎖（シアリルルイスX糖鎖）を有する白血球に特異的に反応性を示し、ノイラミニダーゼ処理によって末端シアル酸を除去した白血球には反応性を示さないことが確認された。

既に実施例3で、本発明におけるモノクローナル抗体2H5がシアリルルイスa糖鎖には反応性を有さず、シアリルルイスX糖鎖に反応性を有することが確認されている。この実施例3の結果及び上記実施例11の結果から、本発明のモノクローナル抗体2H5は、シアリルルイスX糖鎖にのみ特異的に反応性を示すことが確認された。

実施例12 心筋虚血後再灌流障害におけるモノクローナル抗体2H5の抗炎症効果

ラット心筋虚血後再灌流障害モデルを用いて、虚血後再灌流障害に対するモノクローナル抗体2H5の抗炎症作用を検討した。

(1) 外科手術法

7～10週齢ウィスターラット（200～280g）に、ペントバルビタールナトリウム（25 mg/kg）を腹膜内注射して麻酔した。人工呼吸装置（SN-480-7、

信濃製作所)を挿管し、室内空気(換気量 20 ml/kg/60分)を送り込み、酸素を補給した。ラットの左横胸部を開胸し、心膜を切除の後、クランプで圧することにより、冠動脈閉塞を行った。30分後、クランプを取り去ることにより、血液の再灌流を行った。標準第II誘導心電図を連続的に記録しながら、心電図のSTセグメントレベルの変化と心筋の色の変化を観察することにより、心筋全体の虚血と再灌流を確認した。胸を縫合し、ラットを外科麻酔から回復させた。

(2) 抗体処理実験

(1)の外科手術に際し、ラットをモノクローナル抗体2H5投与グループとラットIgM(ジェオクソンイムノリサーチラボラトリーズ(Jeokson)社製)投与グループとPBS(phosphate-buffered saline)投与グループとの3群に分けた。それぞれのグループ(各8匹)に、冠動脈閉塞5分前に、それぞれモノクローナル抗体2H5、ラットIgM及びPBSを 2 mg/kg 体重の濃度で、大腿部静脈内に投与した。再灌流して48時間後、それぞれの心臓の左心室を摘出しPBS溶液で洗浄し、心室を6等分に輪切りにした。各組織切片を塩化トリフェニルテトラゾール(TTC)を1%含有する0.2Mトリス緩衝液(pH8.0、 26°C)中で4分間インキュベートした。かかる処理により、炎症によって壊死した部位は着色せず、一方非壊死部位は赤レンガ色に着色する。

結果を図38～図40に示す。これから、モノクローナル抗体2H5が、虚血後再灌流障害に係わる炎症に対して、有意に抗炎症作用を有することが確認された。

実施例13 E-セ렉チンまたはP-セ렉チンを介した細胞接着のモノクローナル抗体2H5による阻害効果

モノクローナル抗体2H5の、血管内皮細胞膜上のE-セ렉チンまたはP-セ렉チンを介した白血球の血管内皮細胞への接着を阻害する作用を調べるため以下の実験を行った。

ヒト末梢血前骨髄球性細胞株であるHL-60細胞(ATCC CCL-240)を、2',7'-ビス(カルボキシエチル)カルボキシフルオレインテトラアセ

トキシメチルエステル〔モレキュラープローブス (Molecular Probes) 社製〕 $10 \mu\text{M}$ で、 37°C 、 30 分間標識した後に、RPMI 1640 培養液で洗浄し、 1% FCS を含む RPMI 1640 中に浮遊させた。ヒト E-セレクトチンをコードする cDNA (ブリティッシュバイオテクノロジー (British Bio-Technology) 社製) を導入した pME18s ベクター (東京大学丸山和夫博士より分譲、実験医学「遺伝子工学ハンドブック」(別冊)、pp101-107, 1992 年参照) 及びヒト P-セレクトチンをコードする cDNA を導入した CDM8 ベクター (インビトロジェン社製) の各々をエレクトロポレーションで COS 細胞に導入した。 24 時間後、形質転換した各々の細胞をトリプシン処理し、別々の 96 穴培養プレートに移し、 $48 \sim 72$ 時間培養した。プレートを RPMI 1640 培地で洗浄した後、各々のプレートの各ウェルに各々標識 HL-60 細胞 (2×10^6 cell/ml を 0.1 ml)、及びモノクローナル抗体 2H5 ($10 \mu\text{g/ml}$) を加え、 4°C で 20 分間インキュベートした。結合していない細胞を除去するため、RPMI 1640 培養液で静かに 4 回洗浄した。結合している細胞を 0.1% Nonidet. P-40 溶液 $100 \mu\text{l}$ で溶解した。フルオロスキャン II マイクロプレート フルオロメーター (フローラボラトリーズ (Flow Laboratories) 社製) を用いて、 538 nm (485 nm で励起) での蛍光強度を測定することにより、各ウェルの相対細胞数を計数した。統計処理は Student's t-Test によって行った。

なお、対照としてモノクローナル抗体 2H5 の代わりにマウス IgM ($10 \mu\text{g/ml}$ 、ケムコン社製) を用いて同様に測定した。また比較のため、マウス抗ヒト P-セレクトチン抗体 ($5 \mu\text{g/ml}$ 、バイオデザイン (Bioscience Resource Project) 社製) 及びマウス抗ヒト E-セレクトチン抗体 ($10 \mu\text{g/ml}$ 、ブリティッシュバイオテクノロジー社製) を用いて同様に測定した。

その結果を図 4 1 及び図 4 2 に示す。モノクローナル抗体 2H5 によれば、血管内皮細胞膜上の E-セレクトチン及び P-セレクトチンを介した白血球の血管内皮細胞への細胞接着を有意に阻害できることが確認された。

請求の範囲

1. 非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球ローリング阻害剤。
2. 請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体が、更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するものである請求の範囲第1項記載の白血球ローリング阻害剤。
3. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚及び関節からなる群から選ばれる少なくとも1つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第1項または第2項記載の白血球ローリング阻害剤。
4. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、肺、肝臓、心臓、脾臓、皮膚、関節及び腎臓から選ばれる少なくとも1つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第1項または第2項記載の白血球ローリング阻害剤。
5. モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-4525で識別されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体である請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の白血球ローリング阻害剤。
6. 非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球接着阻害剤。
7. 請求の範囲第6項記載のモノクローナル抗体が、更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイスX糖鎖に対して反応性を有するものである請求の範囲第6項記載の白血球接着阻害剤。
8. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚及び関節からなる群から選ばれる少なくとも1つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第6項または第7項記載の白血球接着阻害剤。
9. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、肺、肝臓、心臓、脾臓、皮膚、関節及び腎臓から選ばれる少なくとも1つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第6項または第7項記載の白血球接着阻害剤。
10. モノクローナル抗体が、国際寄託番号FERM BP-4525で識別されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体である請求の範囲第6項

～第 9 項のいずれかに記載の白血球接着阻害剤。

1 1. 非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイス X 糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる白血球組織浸潤阻害剤。

1 2. 請求の範囲第 1 1 項記載のモノクローナル抗体が、更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイス X 糖鎖に対して反応性を有するものである請求の範囲第 1 1 項記載の白血球組織浸潤阻害剤。

1 3. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚及び関節からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第 1 1 項または第 1 2 項記載の白血球組織浸潤阻害剤。

1 4. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、肺、肝臓、心臓、脾臓、皮膚、関節及び腎臓から選ばれる少なくとも 1 つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第 1 1 項または第 1 2 項記載の白血球接着阻害剤。

1 5. モノクローナル抗体が、国際寄託番号 F E R M B P - 4 5 2 5 で識別されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体である請求の範囲第 1 1 項～第 1 4 項のいずれかに記載の白血球組織浸潤阻害剤。

1 6. 非リンパ性組織の血管内皮細胞膜由来のシアリルルイス X 糖鎖に対して反応性を有するモノクローナル抗体を含んでなる抗炎症剤。

1 7. 請求の範囲第 1 6 項記載のモノクローナル抗体が、更に白血球の細胞膜由来のシアリルルイス X 糖鎖に対して反応性を有するものである請求の範囲第 1 6 項記載の抗炎症剤。

1 8. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、脳、気管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚及び関節からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第 1 6 項または第 1 7 項記載の抗炎症剤。

1 9. 非リンパ性組織の血管内皮細胞が、肺、肝臓、心臓、脾臓、皮膚、関節及び腎臓からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの組織の血管内皮細胞である請求の範囲第 1 6 項または第 1 7 項記載の抗炎症剤。

2 0. 炎症が脳、気管、血管、肺、肝臓、心臓、脾臓、腸、腸間膜、腎臓、皮膚

または関節における炎症である請求の範囲第 1 6 項または第 1 7 項記載の抗炎症剤。

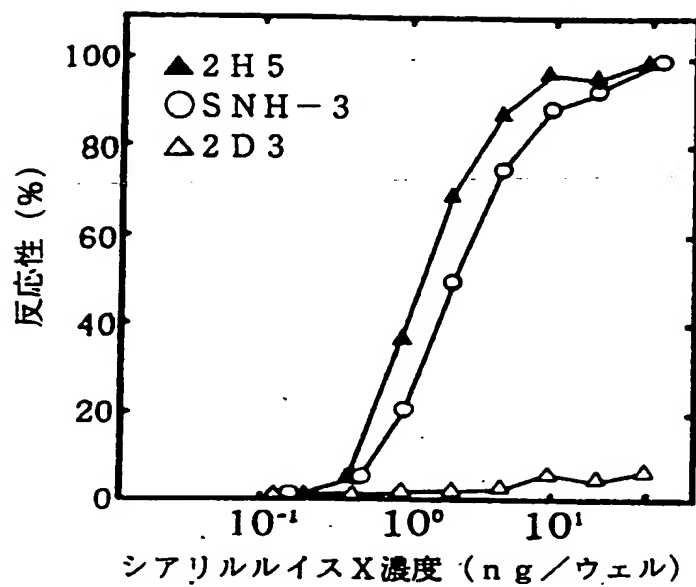
2 1. 炎症が、腎炎、脾炎、肺炎、腸炎、皮膚炎、肝炎、関節炎及び虚血後再灌流障害、移植後免疫拒絶、火傷あるいは多発性臓器障害に係わる炎症である請求の範囲第 1 6 項または第 1 7 項記載の抗炎症剤。

2 2. 炎症が、急性炎症である請求の範囲第 1 6 項～第 2 1 項のいずれかに記載の抗炎症剤。

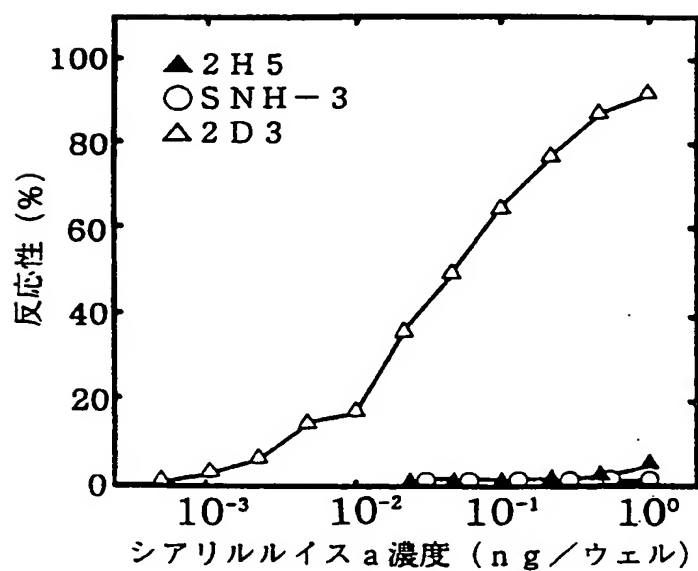
2 3. モノクローナル抗体が、国際寄託番号 F E R M B P - 4 5 2 5 で識別されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体である請求の範囲第 1 6 項～第 2 2 項のいずれかに記載の抗炎症剤。

図 1

A



B



2

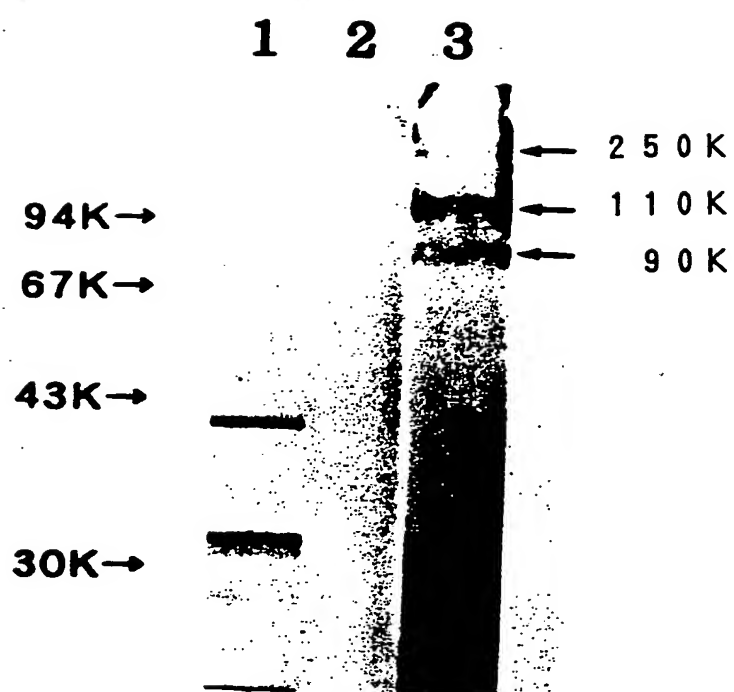


図 3

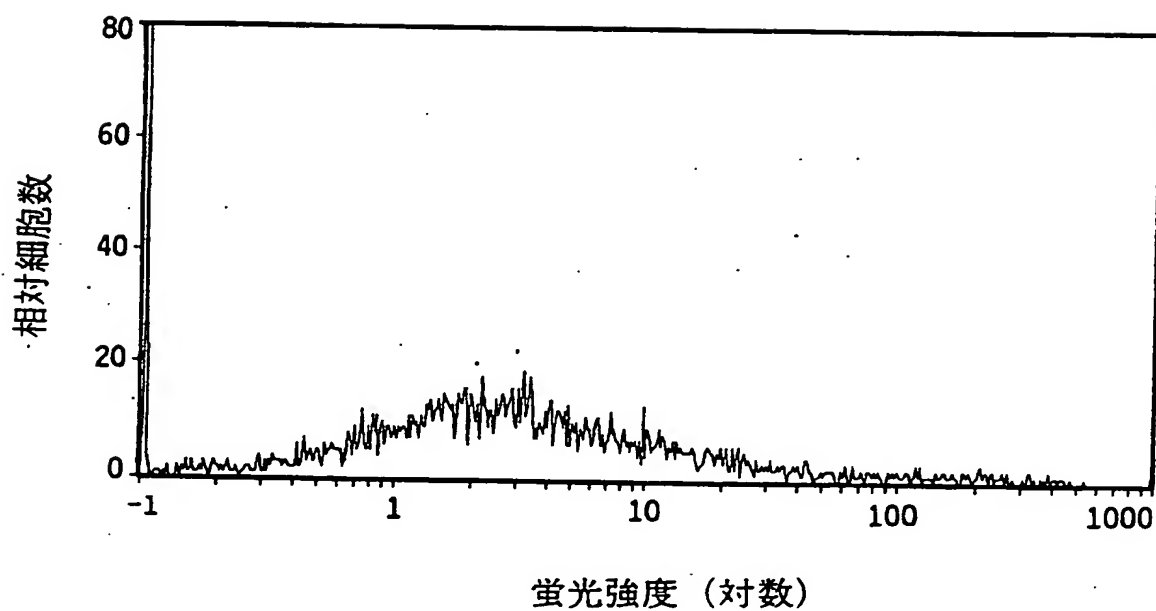


図 4

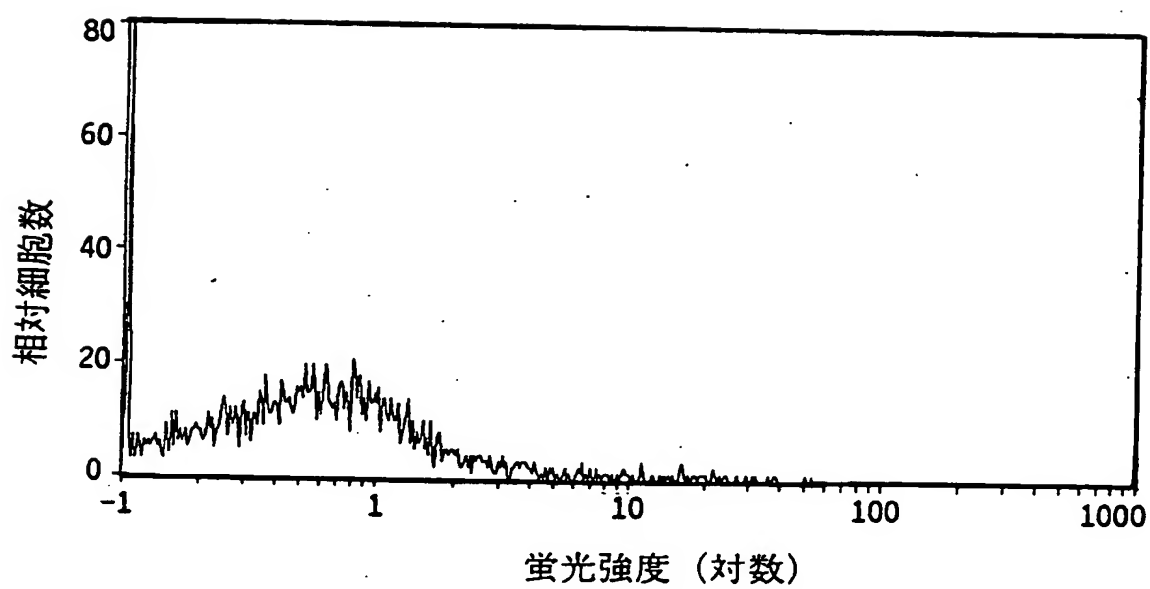


図 5

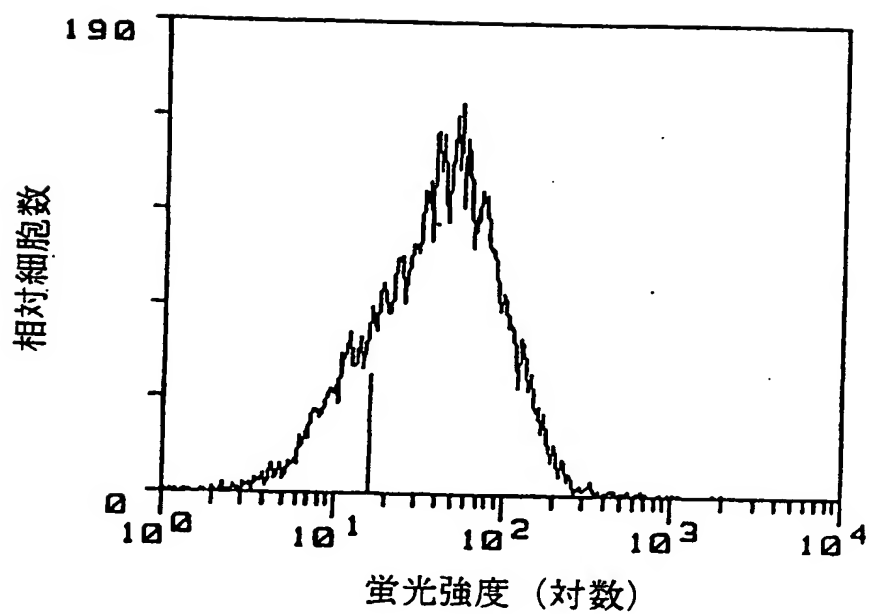


図 6

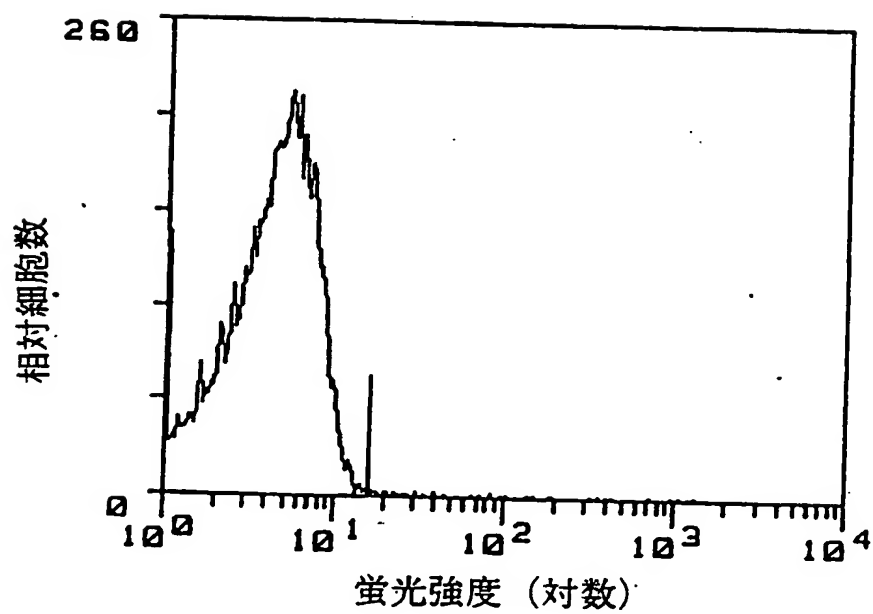


図 7

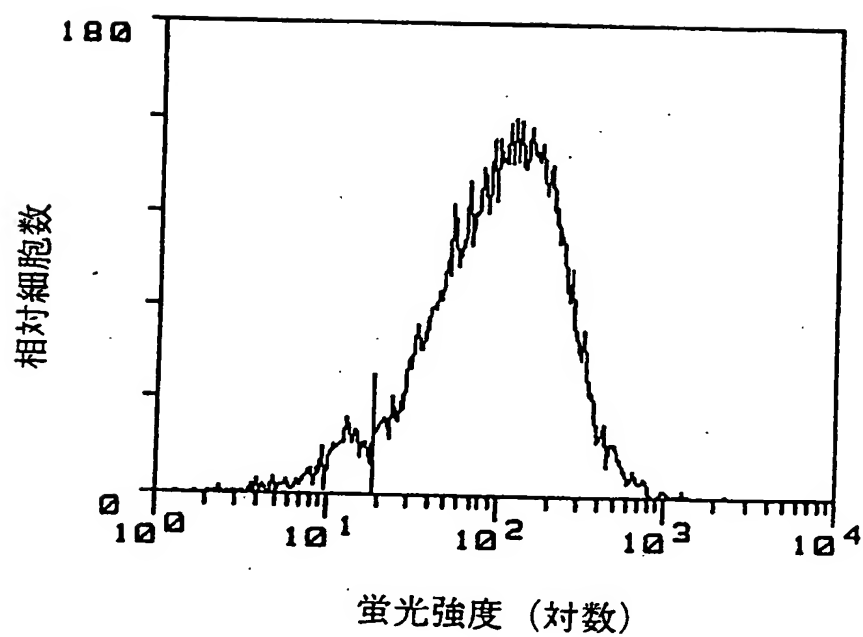


図 8

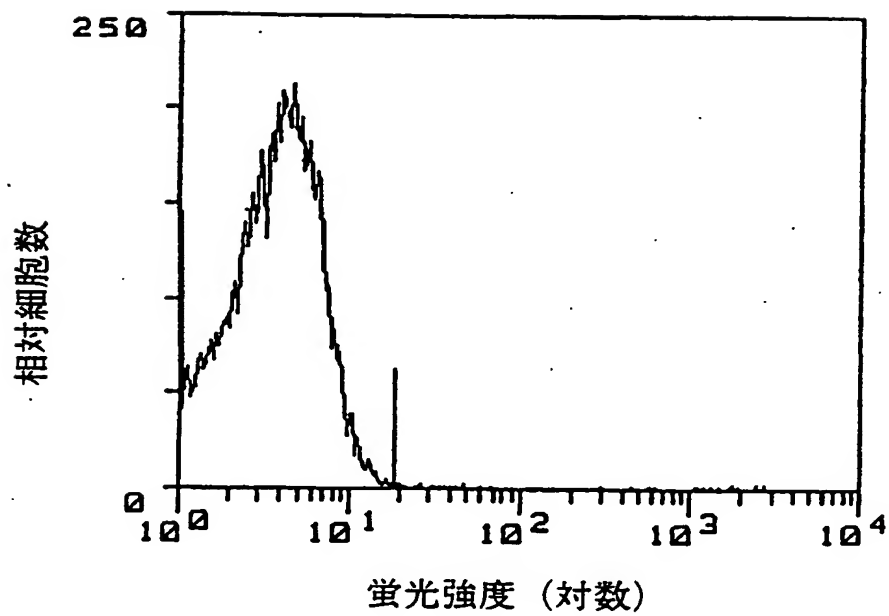


図 9

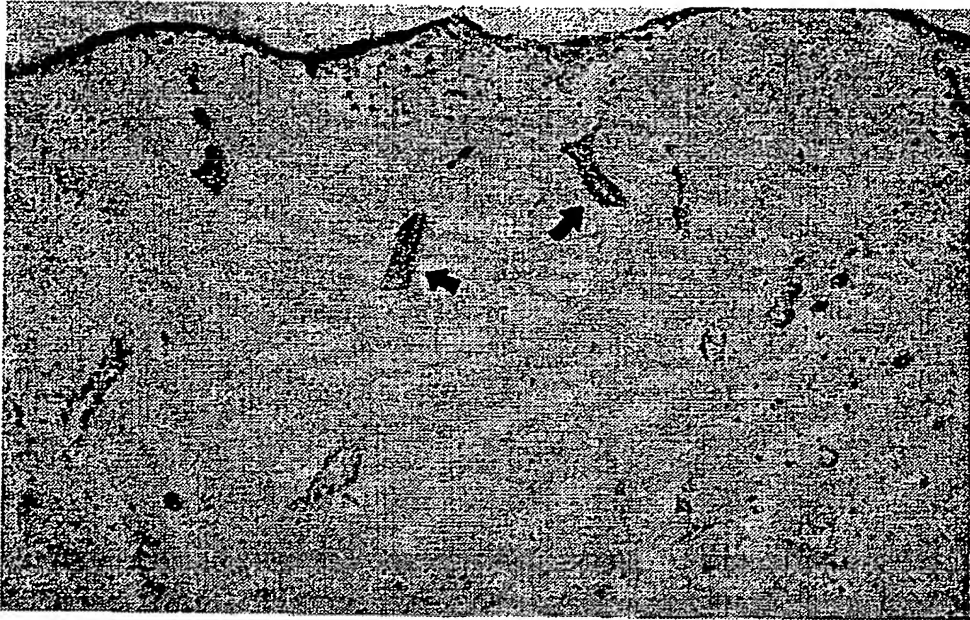


図 10

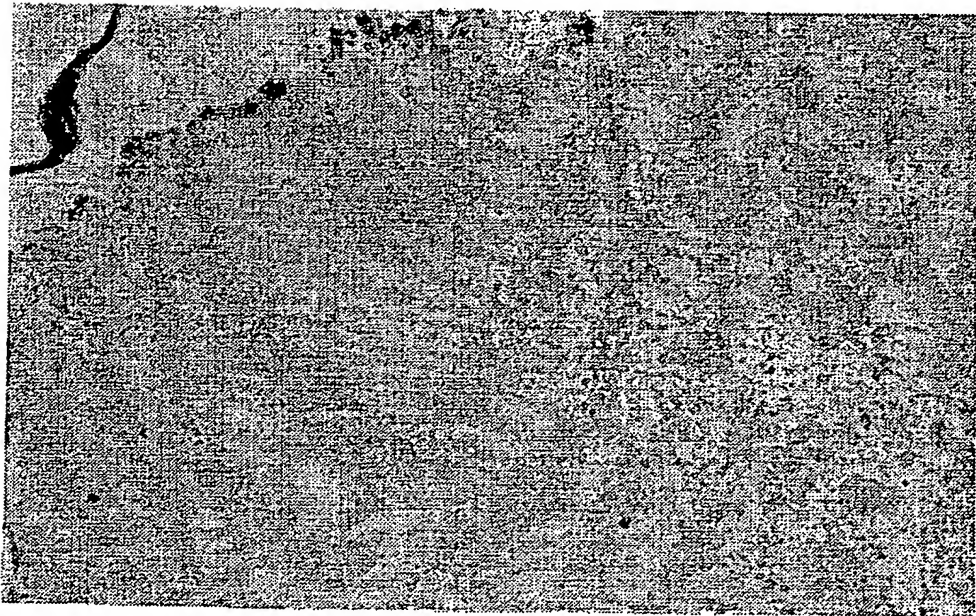


図 1 1



図 1 2

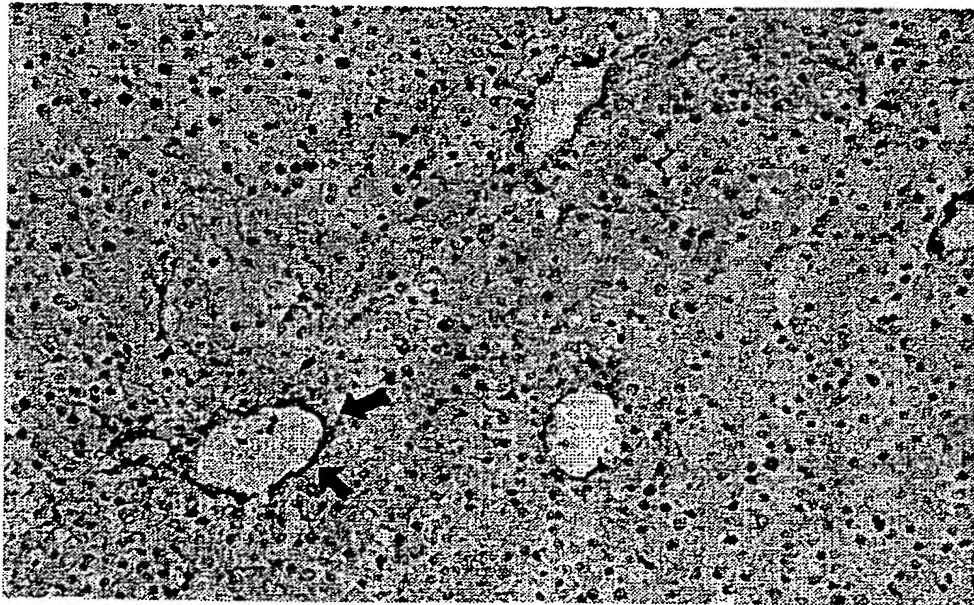


図 1 3

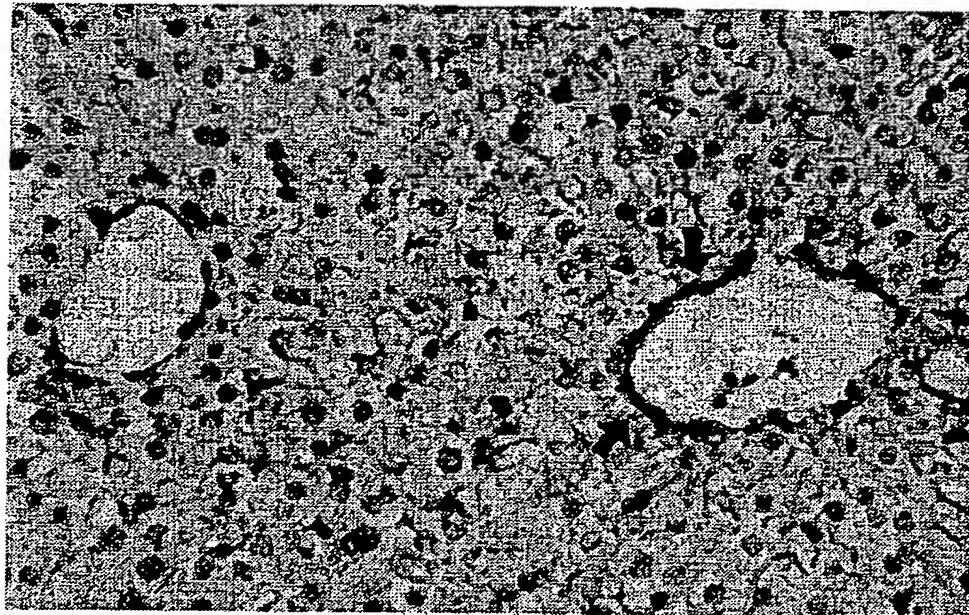


図 1 4

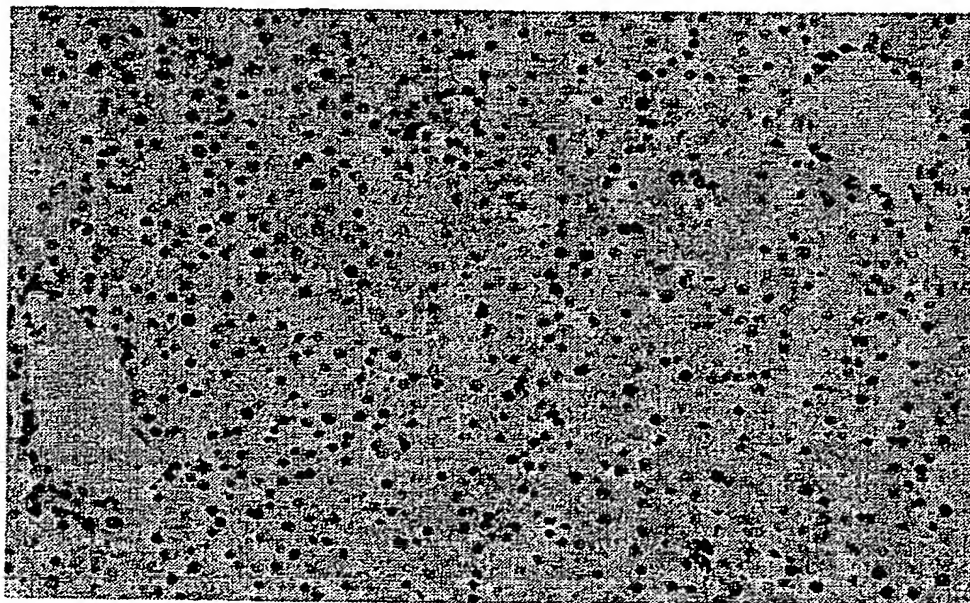


図 1 5

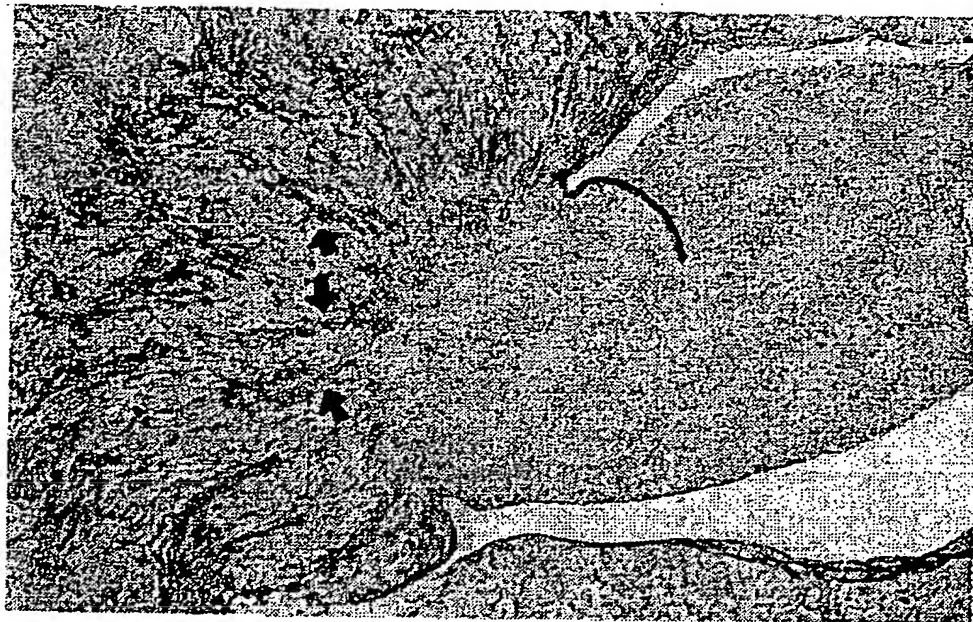


図 1 6

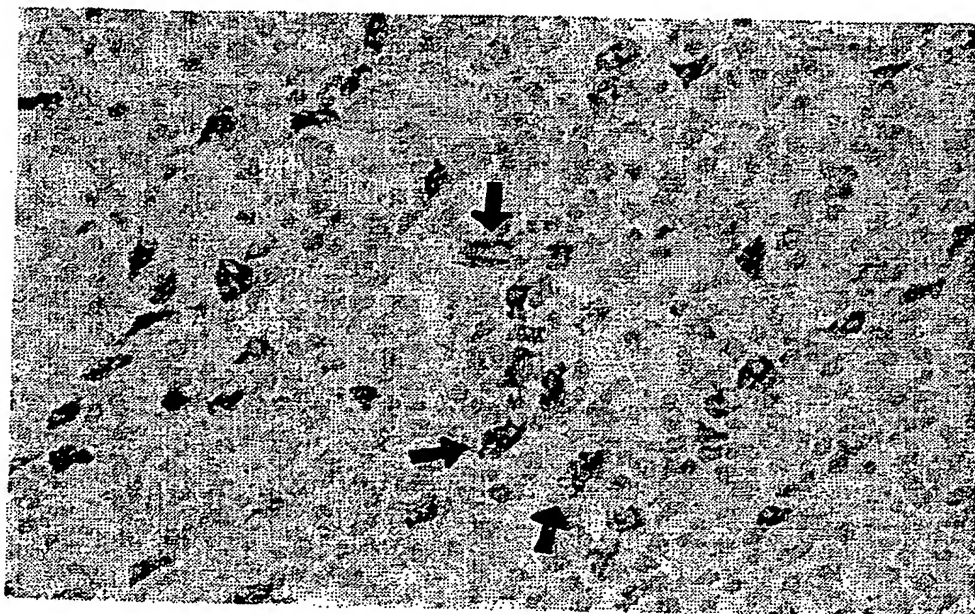


図 1 7



図 1 8

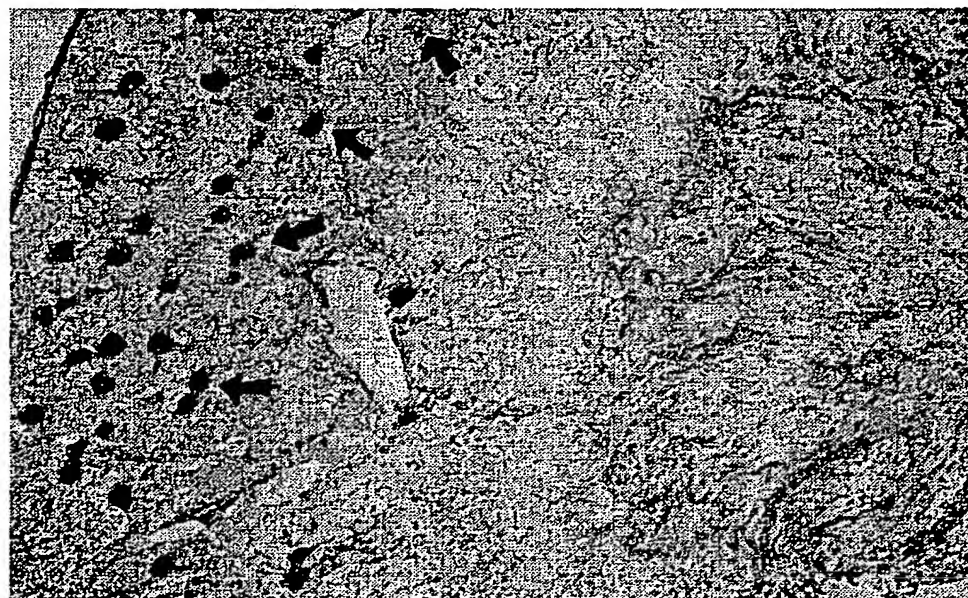


図 19

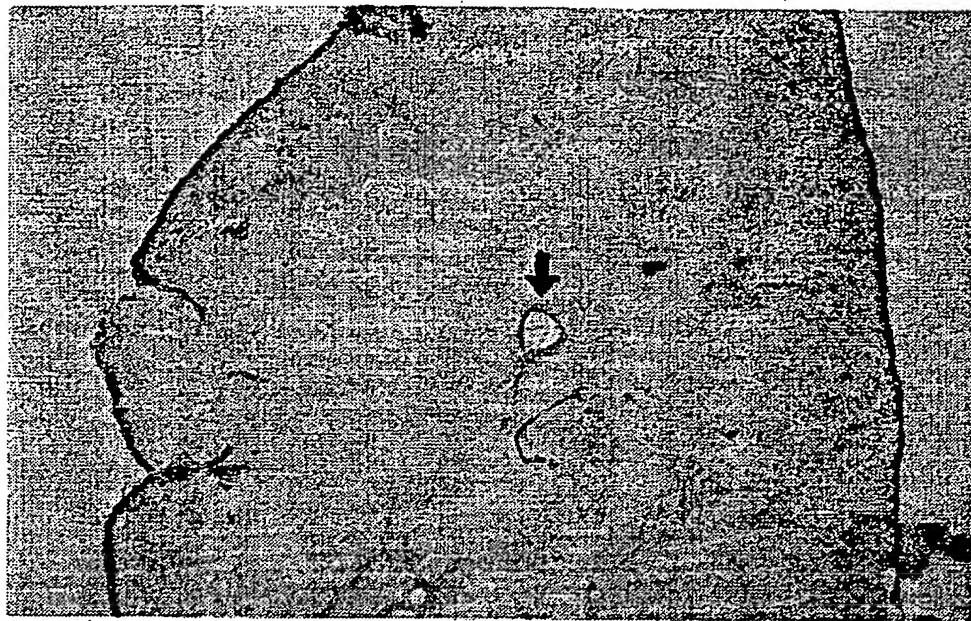


図 20

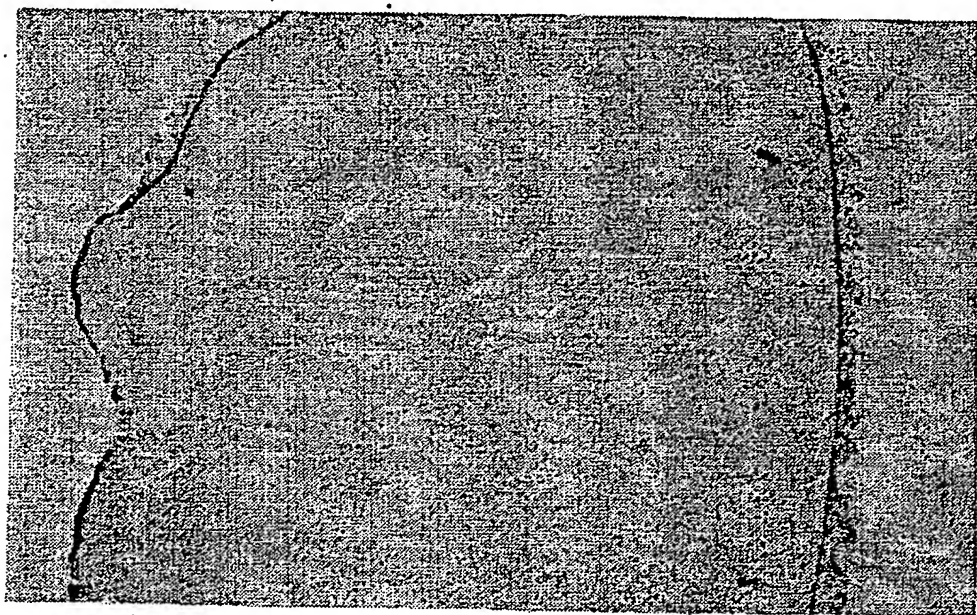


図 2 1

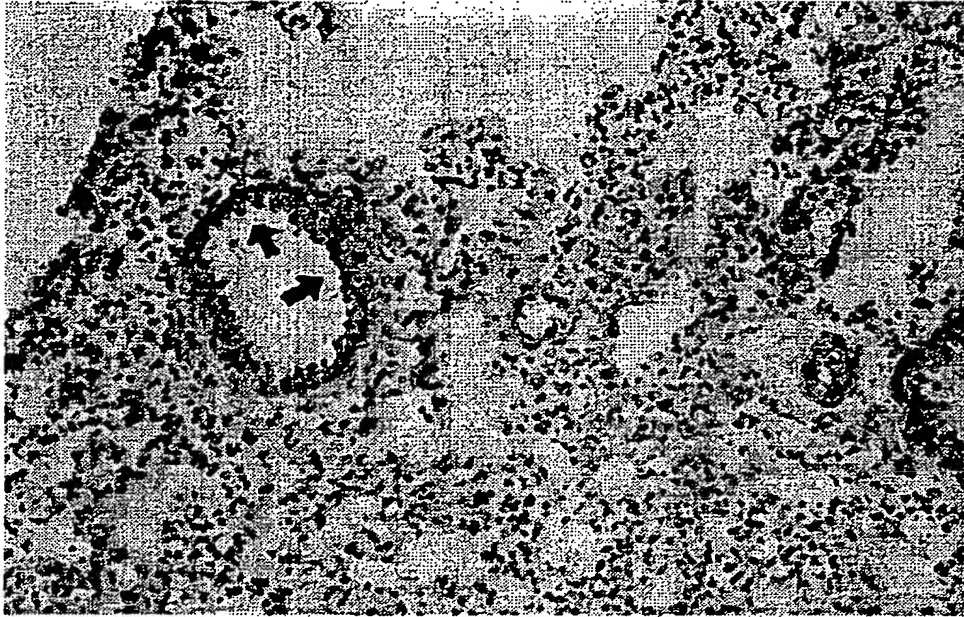


図 2 2



図 2 3

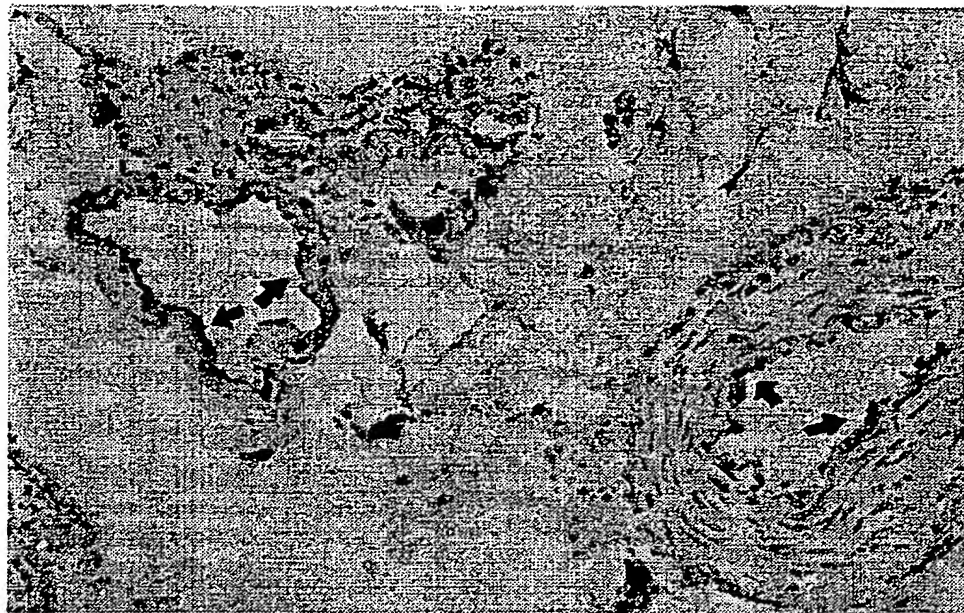


図 2 4



図 2 5

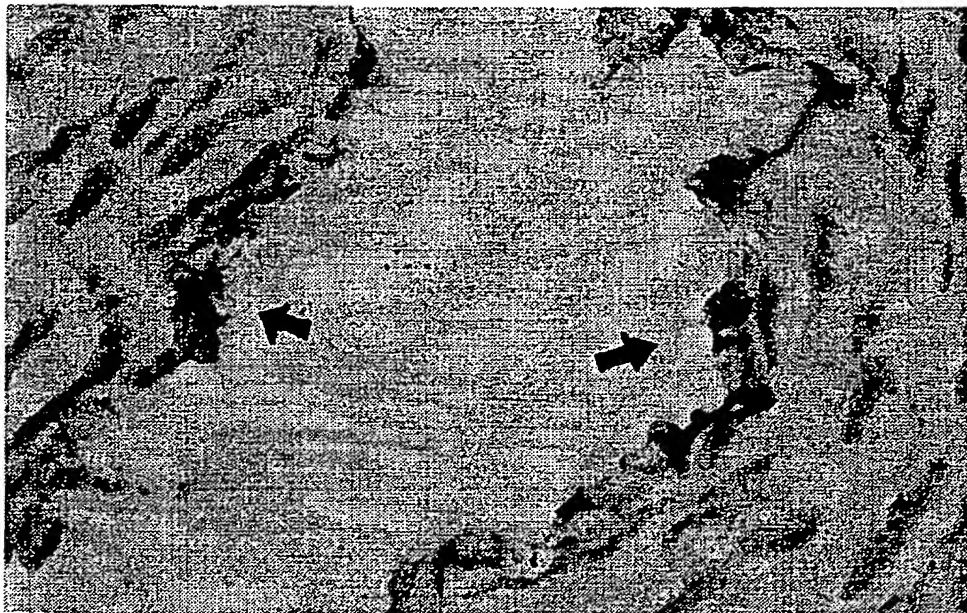


図 2 6



図 2 7

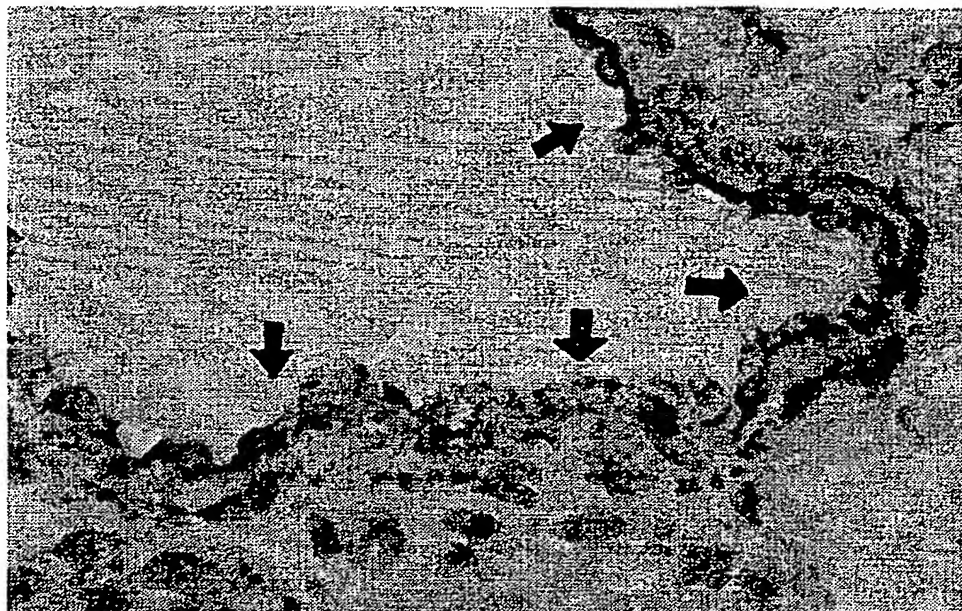


図 2 8

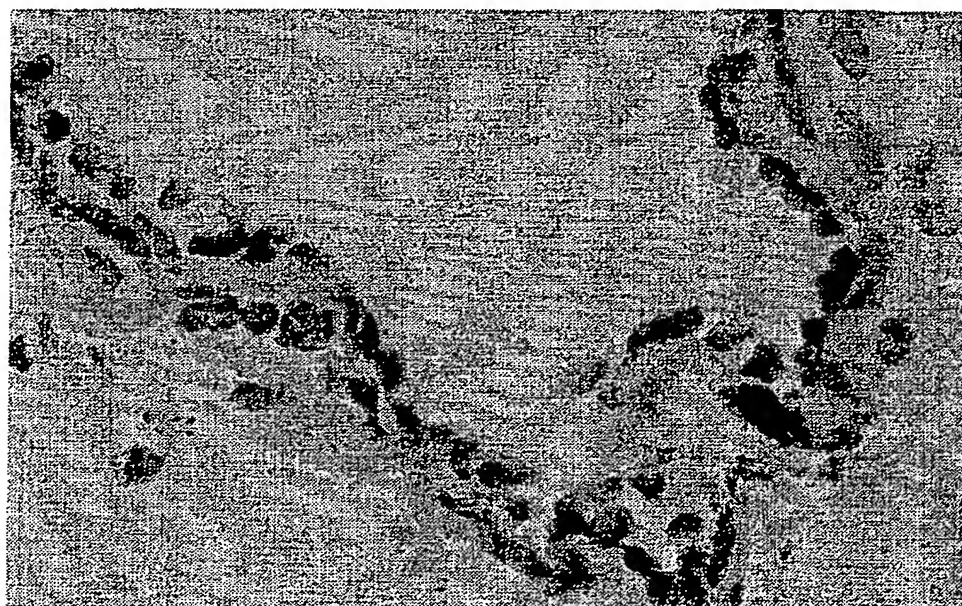


図 29

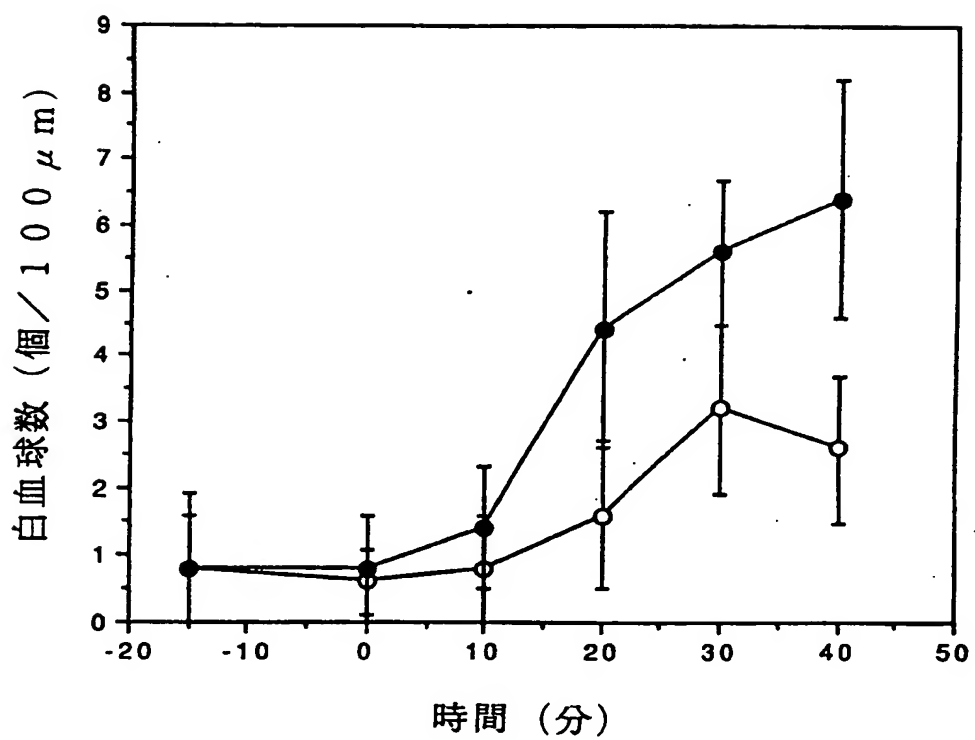


図 30

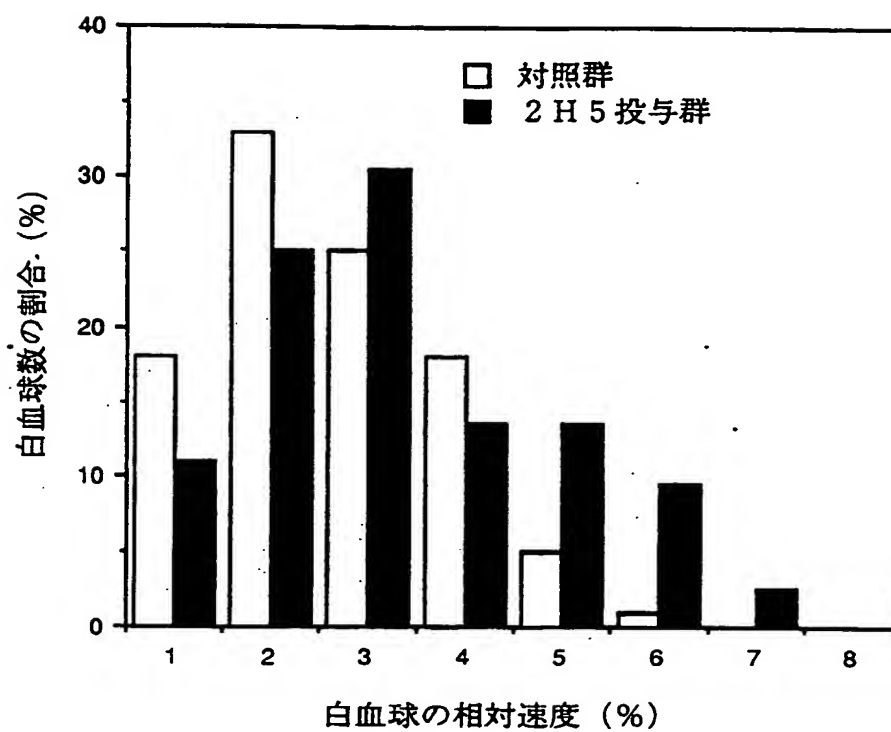


図 3 1

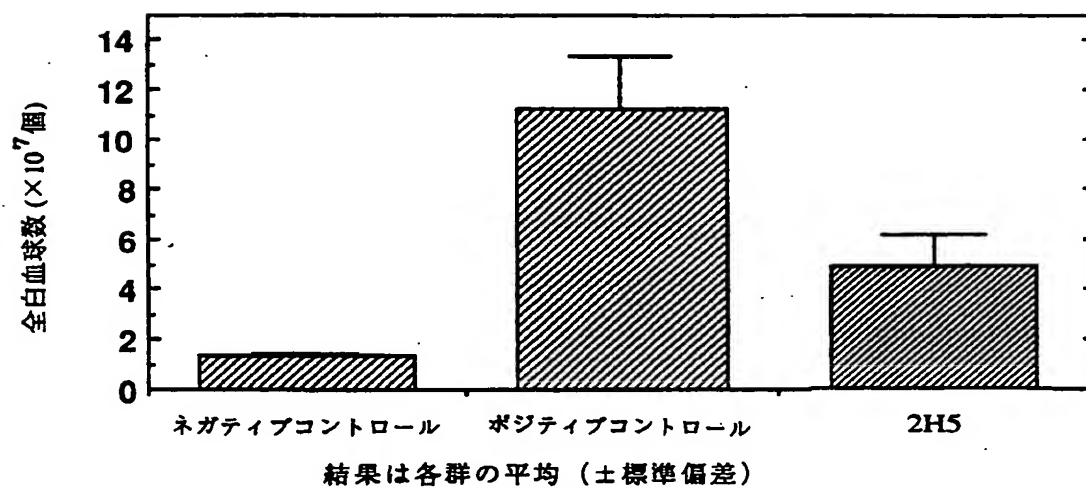


図 3 2

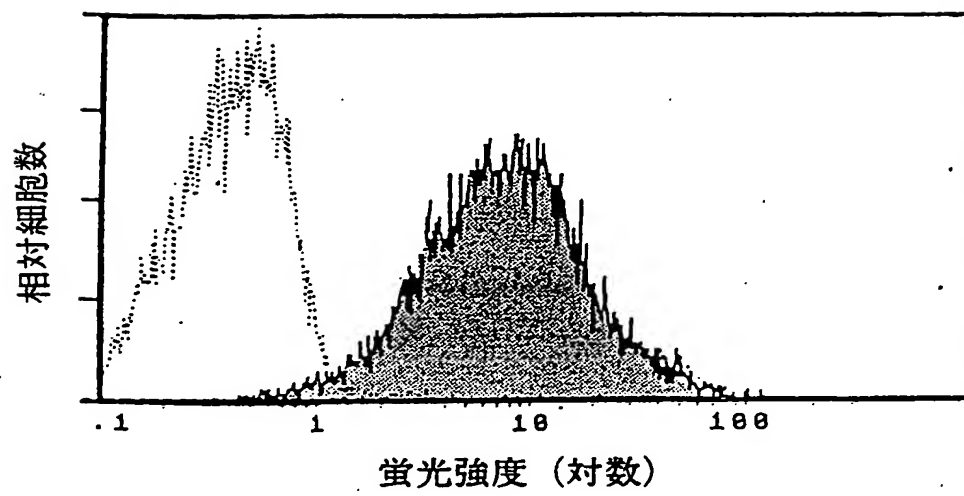


図 3 3

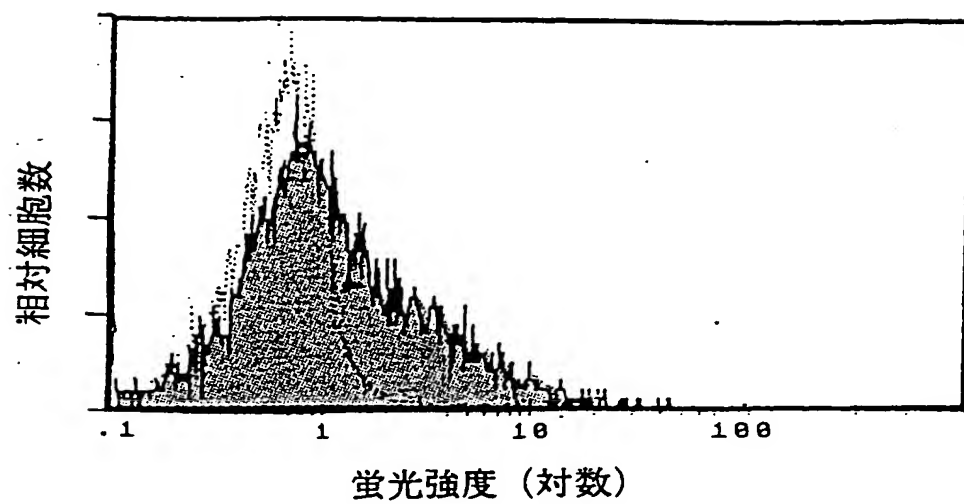


図 3 4

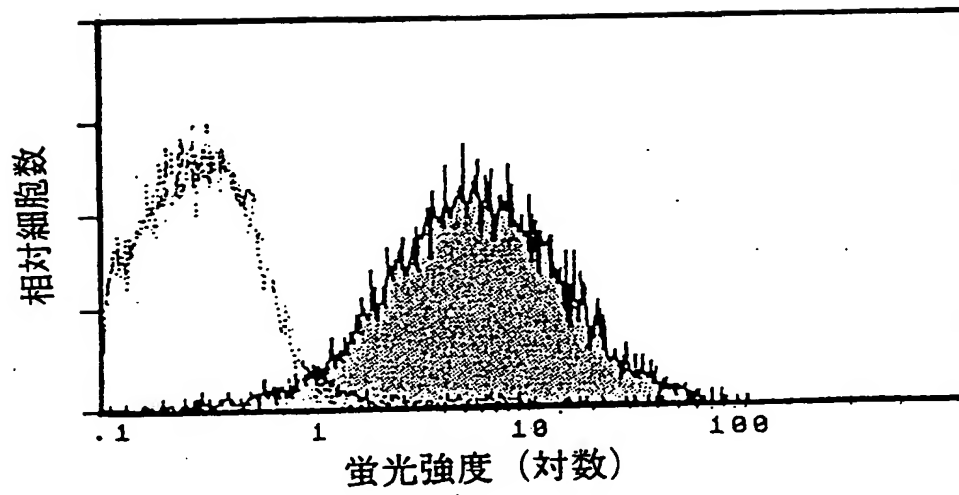


図 3 5

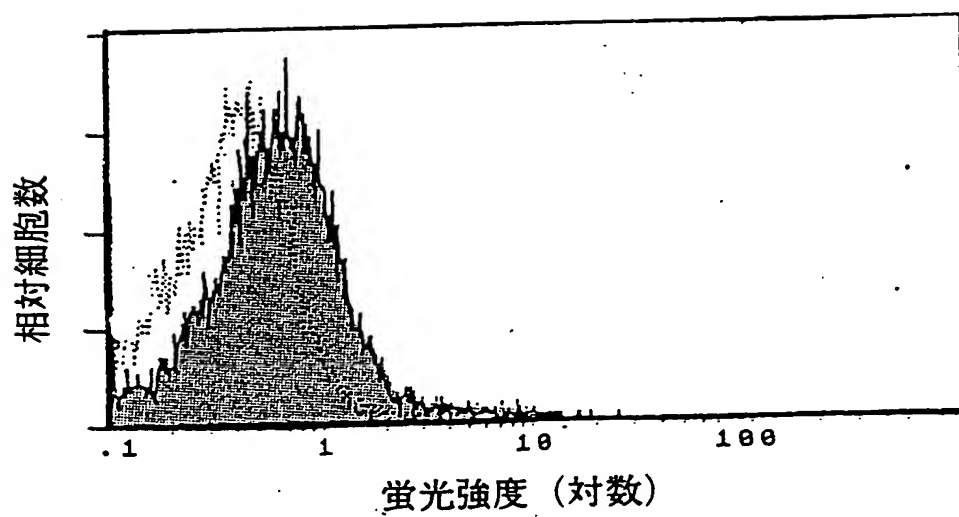


図 3 6

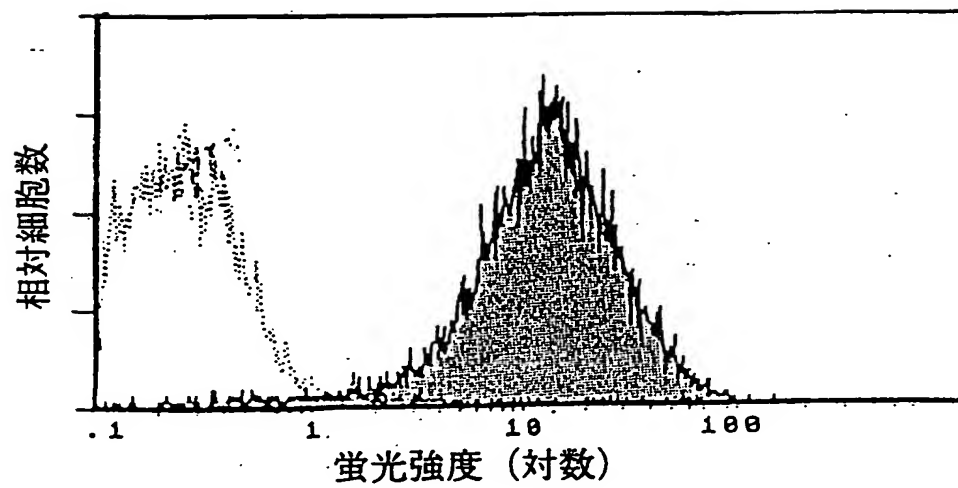


図 3 7

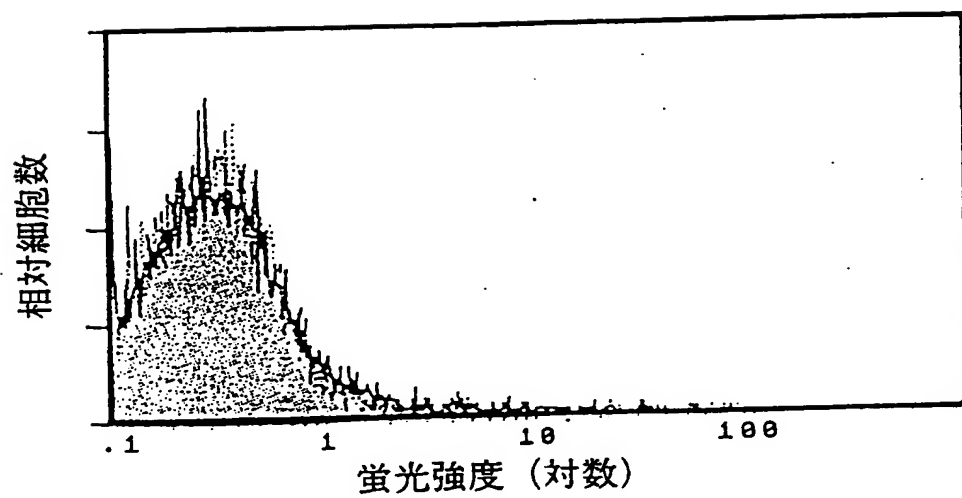


図 3 8



図 3 9

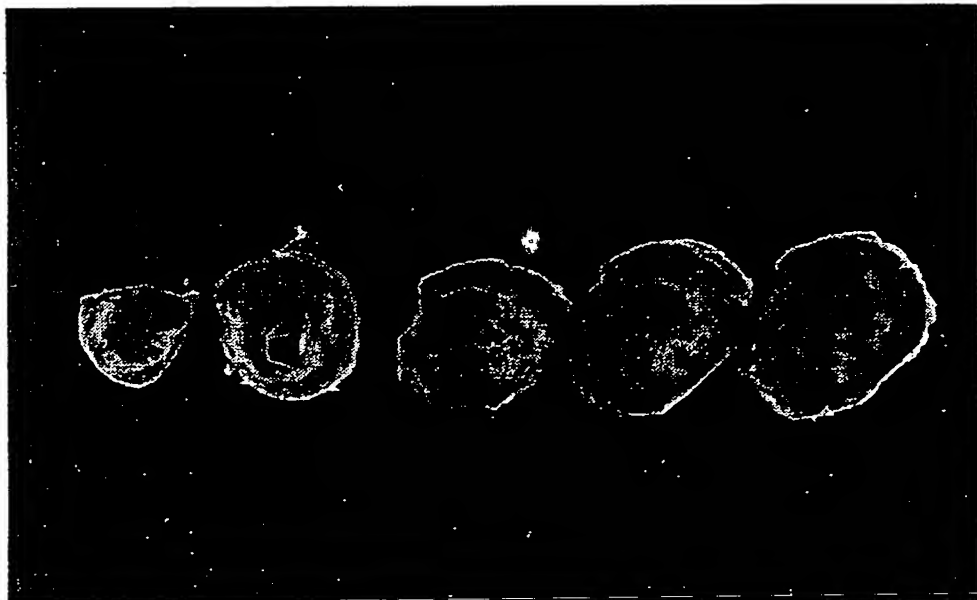
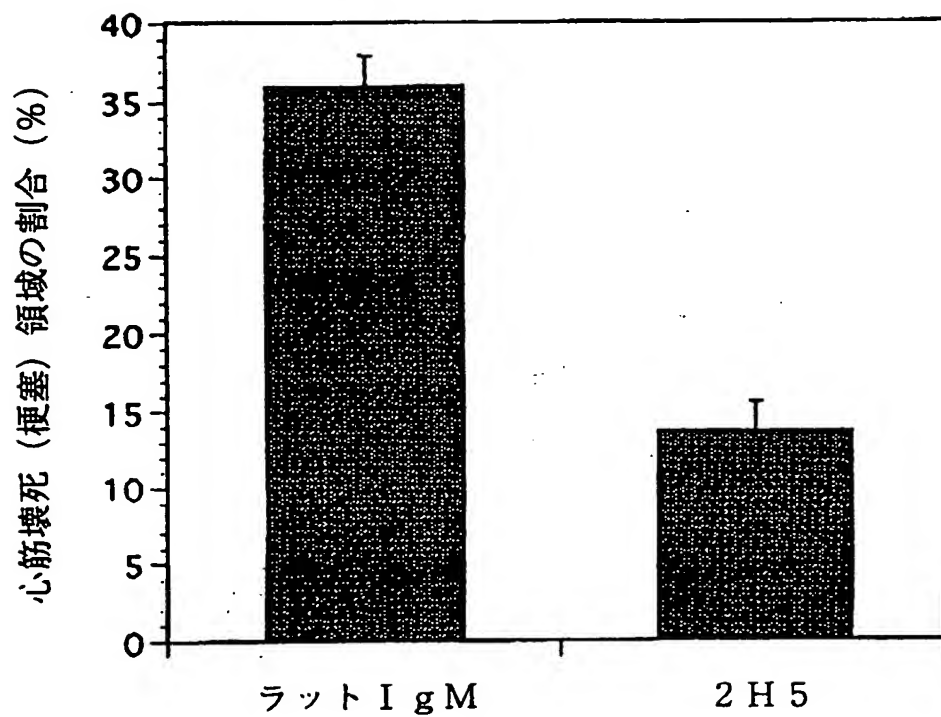


図 40



結果は各群 (n = 8) の平均 (±標準偏差)

図 4 1

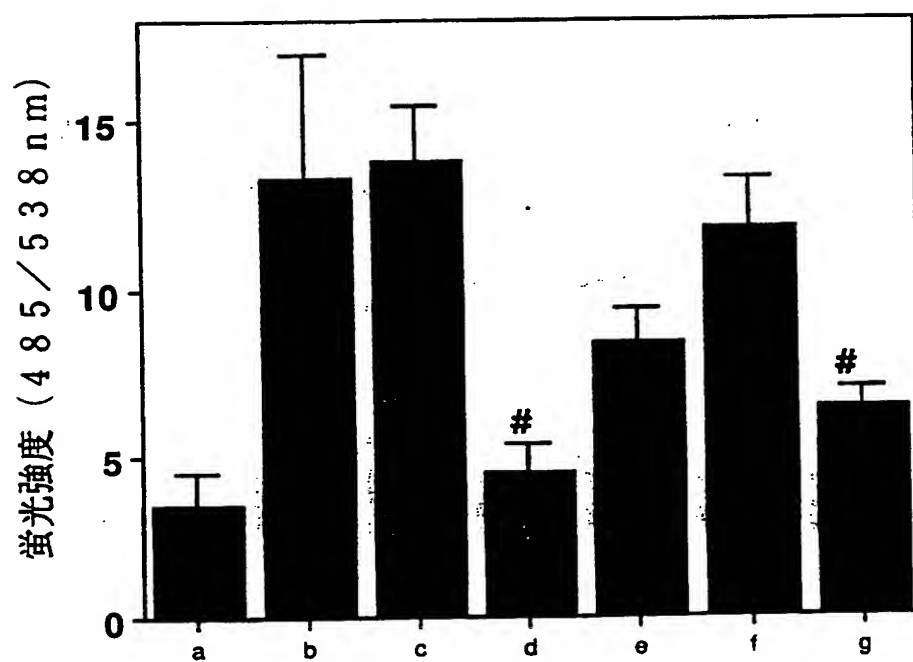
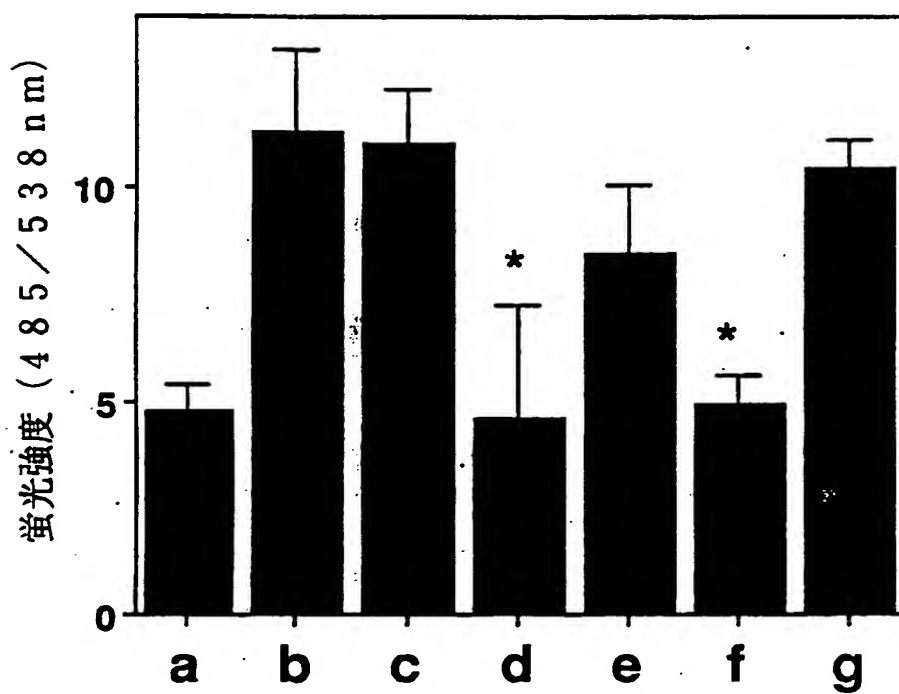


図 4 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A61K39/395//C07K16/18, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A61K39/395//C07K16/18, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Blood, Vol. 82, No. 1, 1993,	1-23
Y	Ulrich H. von Andrian et al. pp. 182-191	1-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 8, 1995 (08. 03. 95)

Date of mailing of the international search report

March 28, 1995 (28. 03. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K39/395//C07K16/18, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K39/395//C07K16/18, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Blood, Vol. 82, No. 1, 1993, Ulrich H. von Andrian et al. pp. 182-191	1-23 1-23

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.03.95

国際調査報告の発送日

28.03.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

池田正人

4 C 9 2 8 4

電話番号 03-3581-1101 内線

3453